

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS
Departamento de Bioquímica y Biología Molecular I



TESIS DOCTORAL

Biotransformación bacteriana de esteroides

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Lorena Fernández Cabezón

Director

José Luis García López

Madrid, 2018

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR



TESIS DOCTORAL
BIOTRANSFORMACIÓN BACTERIANA
DE ESTEROIDES

LORENA FERNÁNDEZ CABEZÓN

DIRECTOR: Dr. JOSÉ LUIS GARCÍA LÓPEZ

CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS
CENTRO DE INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS



MADRID, 2017

El trabajo descrito en esta Tesis Doctoral se ha llevado a cabo en el Departamento de Biología Medioambiental, del Centro de Investigaciones Biológicas del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CIB-CSIC) (Madrid, España). La investigación ha sido financiada por una beca predoctoral FPU del Ministerio de Educación, Cultura y Deporte y por los proyectos BFU2009-11545-C03-03 y BIO2012-39695-C02-01 del Ministerio de Ciencia e Innovación.

A mis padres

AGRADECIMIENTOS

Me gustaría que estas líneas sirvieran para expresar mi más profundo y sincero agradecimiento a todas aquellas personas que han colaborado de alguna manera en la realización de esta Tesis Doctoral.

En primer lugar, me gustaría agradecer la orientación, seguimiento y apoyo recibido a lo largo de estos años de mi supervisor, el Dr. José Luis García. De la misma manera, quiero agradecer la ayuda y el apoyo a cada una de las personas que han formado parte de este laboratorio.

Especial reconocimiento también merece el interés mostrado por mi trabajo y las sugerencias recibidas de los Dres. Eduardo Díaz, M^a Auxiliadora Prieto, Pedro García y Ernesto García. Quisiera hacer extensiva mi gratitud a los compañeros que han formado o forman parte de sus grupos de investigación durante estos años. Gracias también a los grupos de investigación de los Dres. Julián Perera, José María Luengo y José Luis Barredo, por las interesantes discusiones de resultados en las reuniones de proyectos.

Por último, un agradecimiento muy especial merece la comprensión, paciencia y el ánimo recibidos de mi familia y amigos.

A todos ellos, muchas gracias.

ÍNDICE

ABREVIATURAS	i
I. SUMMARY	1
1. Introduction	3
2. Objectives and results	3
3. Conclusions	4
4. References	5
II. RESUMEN	7
1. Introducción	9
2. Objetivos and resultados	9
3. Conclusiones	10
4. Referencias	11
III. INTRODUCCIÓN	13
1. Introducción al mundo de los esteroides	15
1.1. Conceptos generales de esteroides	15
1.1.1. Definición y funciones biológicas de los esteroides naturales	15
1.1.2. Los esteroides como contaminantes ambientales	18
1.1.3. Los esteroides como principios activos farmacológicos	19
1.2. Degradación bacteriana de esteroides	19
1.2.1. Análisis de la diversidad bacteriana	20
1.2.1.1. Actinobacterias	21
1.2.1.2. Proteobacterias	22
1.2.2. Catabolismo bacteriano de esteroides	22
1.2.2.1. Degradación aeróbica del colesterol	22
A. Transporte de colesterol	22
B. Ruta metabólica de degradación del colesterol	24
(i) Ruta alta del catabolismo del colesterol	24
(ii) Ruta central del catabolismo del colesterol	25
(iii) Ruta baja de catabolismo del colesterol	26
C. Regulación transcripcional	26
1.2.2.2. Degradación anaeróbica del colesterol	29

1.2.2.3. Degradación bacteriana de otros esteroides	30
A. Degradación de sales biliares.....	30
B. Degradación de testosterona y otros derivados androgénicos	30
C. Degradación de 17 β -estradiol y otros derivados estrogénicos	30
2. Biotecnología de esteroides	31
2.1. Definición y evolución de la Biotecnología	31
2.1.1. Concepto de Biotecnología.....	31
2.1.2. Breve evolución histórica de la Biotecnología Microbiana	32
2.2. Introducción a la Biotecnología de Esteroides	33
2.2.1. Producción microbiana de intermediarios esteroideos a partir de esteroides.....	33
2.2.1.1. Tipos de aproximaciones.....	35
A. Aproximaciones con tecnologías tradicionales	35
B. Aproximaciones con tecnologías de ADN recombinante	36
2.2.2. Modificación y/o decoración microbiana de moléculas esteroideas	37
2.2.2.1. Tipos de modificaciones microbianas.....	37
A. Reacciones redox (reducción-oxidación):	37
B. Reacciones de hidroxilación:	38
C. Reacciones de oxidación Baeyer–Villiger:	38
2.2.2.2. Tipos de aproximaciones.....	38
A. Aproximaciones con tecnologías tradicionales	38
B. Aproximaciones con tecnologías del ADN recombinante.....	39
2.2.3. Biosíntesis de novo de esteroides	41
2.2.4. Otras aplicaciones biotecnológicas y/o biomédicas del metabolismo microbiano de esteroides	41
IV. OBJETIVOS.....	43
V. MATERIALES Y MÉTODOS	47
1. Cepas bacterianas, plásmidos y oligonucleótidos	49
2. Medios y condiciones de cultivo	55
2.1. Medios y condiciones de cultivo empleados para <i>Mycobacterium</i> sp	55
2.2. Medios y condiciones de cultivo utilizados para otras bacterias	55
2.3. Conservación de las cepas bacterianas.....	56
3. Experimentos de transferencia génica	56

3.1. Transformación de células de <i>Escherichia coli</i>	56
3.2. Transformación de células de <i>Mycobacterium smegmatis</i>	56
3.2.1. Preparación de células electrocompetentes	56
3.2.2. Electroporación	56
4. Técnicas de manipulación de ADN	57
4.1. Electroforesis de ADN en geles de agarosa	57
4.2. Extracción de ADN genómico de micobacterias	57
4.3. Aislamiento de ADN plasmídico en <i>E. coli</i> y <i>M. smegmatis</i>	58
4.4. Reacción de amplificación en cadena con ADN polimerasa termorresistente (PCR)	58
4.5. PCR de colonia o de cultivo líquido en <i>E. coli</i> y <i>M. smegmatis</i>	58
4.6. Secuenciación de ADN	58
4.7. Diseño de genes sintéticos	59
4.8. Construcción de cepas mutantes de <i>M. smegmatis</i> mc ² 155 mediante delección por recombinación homóloga	59
5. Técnicas de manipulación de ARN	61
5.1. Extracción de ARN de micobacterias	61
5.2. Retrotranscripción seguida de reacción de PCR (RT-PCR semicuantitativa)	61
6. Técnicas de manipulación de proteínas	62
6.1. Obtención de extractos proteicos en <i>Mycobacterium</i>	62
6.2. Electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS (PAGE-SDS)	62
7. Técnicas cromatográficas	62
7.1. Extracción de esteroides	62
7.2. Cromatografía en capa fina (TLC)	62
7.3. Cromatografía líquida	63
8. Análisis bioinformáticos	63
9. Biotransformaciones de esteroides	64
9.1. Protocolo de disolución de esteroides	64
9.2. Ensayos de crecimiento	65
9.3. Biotransformaciones en resting-cell	65
9.4. Biotransformaciones en crecimiento	65
VI. RESULTADOS	67
1. Descubrimiento de una ruta alternativa para la degradación de esteroides C-19	69
1.1. Descripción del fenotipo C-19+ en <i>M. smegmatis</i> : catabolismo de esteroides C-19	69

1.1.1. Cultivo de <i>M. smegmatis</i> en esteroides C-19: el fenotipo C-19+	69
1.1.2. Descifrando el fenotipo C-19+	72
1.1.3. Identificación <i>in silico</i> y anotación del <i>cluster</i> C-19+	75
1.1.4. Análisis de expresión génica del <i>cluster</i> C-19+	80
1.1.5. Identificación de mutaciones responsables del fenotipo C-19+	82
1.1.6. Construcción de un mutante $\Delta padR$	84
1.1.7. Origen de los mutantes C-19+ en la población microbiana	86
1.8. Determinación de la función biológica de los genes del <i>cluster</i> C-19+ en <i>M. smegmatis</i> ..	87
1.1.8.1. Determinación de la función biológica de los genes <i>MSMEG_2867</i> , <i>MSMEG_2869</i> , <i>MSMEG_2870</i> y <i>MSMEG_2893</i> . Ensayos de funcionalidad por complementación y <i>resting-cell</i>	87
1.1.8.2. Construcción de los mutantes MS2891, MS2892 y MS2900	89
1.1.9. Ruta C-19+ para el catabolismo de esteroides C-19	92
1.2. Identificación del <i>cluster</i> C-19+ en otras bacterias	95
1.2.1. Especies de micobacterias	95
1.2.1.1. Comparativa genómica con especies depositadas en bases de datos	95
1.2.1.2. Comparativa genómica con cepas industriales de producción de intermediarios esteroideos	96
1.2.2. Otras actinobacterias modelo degradadoras de esteroides	98
1.2.2.1. Comparativa genómica con <i>G. neofelfaecis</i> NRRL B-59395	98
1.2.2.2. Comparativa genómica con <i>R. jostii</i> RHA1	100
1.2.2.3. Comparativa genómica con <i>N. simplex</i> VKM Ac-2033D	101
1.2.3. Otras especies de actinobacterias	104
1.2.4. Análisis filogenéticos de clusters de catabolismo de esteroides	104
2. <i>M. smegmatis</i>: una biofactoría para la producción de esteroides	109
2.1. Producción de 9OH-AD a partir de esteroides	110
2.1.1. Hipótesis de trabajo: identificación <i>in silico</i> de las enzimas KSH y KstD de <i>M. smegmatis</i> <i>mc²155</i>	111
2.1.2. Producción de 9OH-AD en biotransformaciones en crecimiento	112
2.2. Producción de testosterona	114
2.2.1. Hipótesis de trabajo	114
2.2.1.1. Selección de <i>M. smegmatis</i> como biofactoría celular para la producción de TS... ..	115
2.2.1.2. Búsqueda de enzimas 17 β -HSD candidatas de origen microbiano	115
2.2.1.3. Esquema de la trabajo para la producción de TS en <i>M. smegmatis</i>	116
2.2.2. Producción de TS en biotransformaciones en <i>resting-cell</i>	119

2.2.3. Producción de TS en biotransformaciones en crecimiento.....	120
2.3. Otras modificaciones esteroideas de relevancia industrial.....	123
2.3.1. Hipótesis de trabajo: selección de los genes <i>kstD</i> y <i>kshA</i>	124
2.3.2. Producción de 3-ceto- Δ 1,2-esteroides en biotransformaciones en <i>resting-cell</i>	126
2.3.3. Producción de 9 α -hidroxi-3-cetoesteroides en biotransformaciones en <i>resting-cell</i>	128
VII.DISCUSIÓN	129
1. Descubrimiento de una ruta alternativa para la degradación de esteroides C-19	131
1.1. Catabolismo de esteroides C-19 en <i>M. smegmatis</i>	131
1.1.1. Descripción del fenotipo C-19+.....	131
1.1.2. Identificación de un <i>cluster</i> génico involucrado en la degradación de esteroides C-19.	132
1.1.3. Reformulación del catabolismo de esteroides	135
1.1.4. Identificación del origen de los mutantes en la población microbiana	140
1.2. Catabolismo de esteroides en otras bacterias	141
1.2.1. Identificación del <i>cluster</i> C-19+ en otras actinobacterias.....	141
1.2.1.1. Especies de micobacterias	141
1.2.1.2. <i>G. neofelfaecis</i> NRRL B-59395.....	142
1.2.1.3. <i>R. jostii</i> RHA1	142
1.2.1.4. <i>N. simplex</i> VKM Ac-2033D	143
1.2.1.5. Otras especies de actinobacterias.....	144
1.2.2. Comparativa genómica global de los <i>clusters</i> C-19+	144
1.2.2.1. Comparativas de proteínas PadR.....	144
1.2.2.2. Otras comparativas generales.....	147
1.2.3. Evolución del catabolismo de esteroides en bacterias	147
2. <i>M. smegmatis</i>: una biofactoría para la producción de esteroides	149
2.1. Ingeniería metabólica de la ruta catabólica de esteroides para la producción de intermediarios esteroideos de interés industrial.....	150
2.1.1. Producción de AD, ADD y 9OH-AD	150
2.1.1.1. <i>Mycobacterium</i> sp.....	150
2.1.1.2. Otras actinobacterias: <i>Rhodococcus</i> sp.	152
2.1.2. Producción de testosterona	153
2.2. Otras modificaciones esteroideas de relevancia industrial.....	156
2.2.1. Δ 1,2-deshidrogenación de 3-cetoesteroides	156
2.2.2. 9 α -Hidroxilación de 3-cetoesteroides	159

3. Retos actuales de la Biotecnología de Esteroides	160
3.1. Retos a corto plazo	160
3.1.1. Secuenciación y anotación de genomas de cepas industriales.....	160
3.1.2. Implementación de nuevas herramientas de edición genómica	161
3.1.3. Descifrado de la complejidad del catabolismo de esteroides en actinobacterias modelo.....	161
3.1.4. Experimentos de evolución adaptativa en laboratorio para la mejora de fenotipos complejos	161
3.1.5. Implementación de nuevas alternativas tecnológicas.....	162
3.2. Retos a medio-largo plazo	163
3.2.1. Biosíntesis <i>de novo</i> de esteroides	163
3.2.2. Producción a la carta de esteroides	163
 VIII. CONCLUSIONES.....	 165
 IX. BIBLIOGRAFÍA	 169
 X. ANEXOS	 197

ABREVIATURAS

°C	Grado centígrado
1,4-BNC	Ácido 3-oxo-23,24-bisnorcola-1,4-dien-22-oico
1,4-HBC	22-Hidroxi-23,24-bisnorcol-1,4-dien-3-ona
3-HSA	3-Hidroxi-9,10-secoandrosta-1,3,5(19)-trien-9,17-diona
3,4-DHSA	3,4-Dihidroxi-9,10-secoandrosta-1,3,5(10)-trien-9,17-diona
3OChA-CoA	Ácido 4-colesten-3-ona-26-oico activado con CoA
3 β -HSD	3- β -Hidroxi- Δ^5 -esteroide deshidrogenasa/isomerasa
4-BNC	Ácido 3-oxo-23,24-bisnorcola-4-en-22-oico
4-HBC	22-Hidroxi-23,24-bisnorcol-4-en-3-ona
4,9-DSHA	4,5,9,10-Diseco-3-hidroxi-5,9,17-trioxoandrosta-1(19),2-dien-4-oico
5OH-HIP	Propionato de 5-hidroxi-metilhexahidro-1-indanona
9OH-AD	9-Hidroxi-4-androsten-3,17-diona
9OH-ADD	9-Hidroxi-1,4-androstadien-3,17-diona
11OH-AD	11-Hidroxi-4-androsten-3,17-diona
11OH-ADD	11-Hidroxi-1,4-androstadien-3,17-diona
17 β -HSD	17 β -Hidroxiesteroide deshidrogenasa
A	Adenina
aa	Aminoácido (s)
AD	Androst-4-en-3,17-diona
ADC	Albúmina/Dextrosa/Catalasa
ADD	Androst-1,4-dien-3,17-diona
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNc	ADN complementario
Ap	Ampicilina
Ap ^R	Resistencia a ampicilina
API	Principio activo farmacológico
ARN	Ácido ribonucleico
ATP	Adenosina-5'-trifosfato
BSA	Albúmina de suero bovino
C	Citosina
Cho	Colesterol
ChOx	Colesterol oxidasa
CoA	Coenzima A
Da	Dalton

Abreviaturas

DHEA	Deshidroepiandrosterona
DMAPP	Dimetilalil-pirofosfato
DMSO	Dimetilsulfóxido
dNTP	Desoxinucleótido trifosfato
D.O.₆₀₀	Densidad óptica medida a 600 nm
DOC	11-Desoxicorticosterona o 21-hidroxiprogesterona
EDTA	Ácido etilendiaminotetracético
FAD	Flavín adenín dinucleótido
G	Guanina
Gm	Gentamicina
Gm^R	Resistencia a gentamicina
h	Hora(s)
HHd	Ácidos 2-hidroxihexa-2,4-dienoico
HIP	Ácido 9,17-dioxo-1,2,3,4,10,19-hexanorandrostan-5-oico
HPLC	Cromatografía líquida de alta eficacia
HsaAB	3-Hidroxi-9,10-secoandrosta-1,3,5(10)-trien-9,17-diona 4-hidroxilasa
HsaC	3,4-Dihidroxi-9,10-secoandrosta-1,3,5(10)-trien-9,17-diona dioxigenasa
HsaD	Ácido 4,5-9,10-diseco-3-hidroxi-5,9,17-trioxoandrosta-1(10),2-dien-4-oico hidroxilasa
HsaE	2-Hidroxipentadionato hidratasa
HsaF	4-Hidroxi-2-cetovaleatoaldolasa
HsaG	Acetaldehído deshidrogenasa
IPP	Isopentenil-pirofosfato
kDa	1000 Dalton
Km	Kanamicina
Km^R	Resistencia a kanamicina
Ksh	3-Cetoesteroide-9 α -hidroxilasa
KshA	Componente hidroxilasa de la actividad 3-cetoesteroide-9 α -hidroxilasa
KshB	Componente reductasa de la actividad 3-cetoesteroide-9 α -hidroxilasa
KstD	3-Cetoesteroide- Δ^1 -deshidrogenasa
kV	Kilovoltios
LB	Medio de cultivo Luria-Bertani
MEP	Ruta del 2C-metil-D-eritritol-4-fosfato
min	Minuto
mg	Miligramo
mL	Mililitro

mM	Milimolar
MVA	Ruta del mevalonato
NaCl	Cloruro de sodio
NAD	Nicotinamida-adenina-dinucleótido
NADH	Nicotinamida-adenina-dinucleótido reducido
NADP	Fosfato de nicotinamida-adenina-dinucleótido
NADPH	Fosfato de nicotinamida-adenina-dinucleótido reducido
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
ng	Nanogramo
nm	Nanómetro
nt	Nucleótido(s)
p/V	Relación peso/volumen
PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida
pb	Pares de bases
PCR	Reacción de amplificación en cadena con DNA Polimerasa Termorresistente
PDB	<i>Protein Data Bank</i>
PREG	Pregnenolona
PROG	Progesterona
RBS	Secuencia de unión al ribosoma
rpm	Revoluciones por minuto
RT-PCR	Reacción de retrotranscripción acoplada a PCR
SDR	Familia proteica de oxidorreductasas (SDR: <i>Short-chain dehydrogenase reductase</i>)
SDS	Dodecilsulfato sódico
T	Timina
TAE	Tampón Tris-Acetato-EDTA
TE	Tampón Tris-EDTA
TLC	Cromatografía en capa fina
Tris	Tri(hidroximetil)aminometano
TS	Testosterona
UV	Ultravioleta
V	Voltio
v/v	Relación volumen-volumen
μF	Microfaradio
μg	Microgramo
μm	Micrómetro

Abreviaturas

μM	Micromolar
μ_{max}	Velocidad de crecimiento específica máxima
Ω	Ohmio

ABREVIATURAS PARA AMINOÁCIDOS

Ala (A): Alanina	Gly (G): Glicina	Pro (P): Prolina
Arg (R): Arginina	His (H): Histidina	Ser (S): Serina
Asn (N): Asparragina	Ile (I): Isoleucina	Thr (T): Treonina
Asp (D): Aspartato	Leu (L): Leucina	Trp (W): Triptófano
Cys (C): Cisteína	Lys (K): Lisina	Tyr (Y): Tirosina
Gln (Q): Glutamina	Met (M): Metionina	Val (V): Valina
Glu (E): Glutamato	Phe (F): Fenilalanina	

I. SUMMARY

Bacterial biotransformation of steroids

1. Introduction

Steroid compounds are a family of molecules of great biological importance due to their abundance in nature and their participation in a wide range of cellular and physiological functions in different organisms (Lednicer, 2011; Nelson and Cox, 2012). Since the mid-twentieth century, the number of steroid molecules has increased considerably due to the chemical synthesis of a large number of xenobiotic compounds with different pharmacological properties.

The study of microbial pathways of steroid degradation has aroused great interest in the scientific community in recent decades, driven by the abundance of natural steroids and the considerable increase of xenobiotic steroid contaminants in the environment (García *et al.*, 2012). A considerable number of these studies have been performed with Actinobacteria (Actinomycetes) and in particular, with representatives of the suborder Corynebacterineae such as *Mycobacterium*, *Rhodococcus* and *Gordonia*. These genera include pathogenic bacteria such as *Mycobacterium tuberculosis* or *Rhodococcus equi*, and non-strictly pathogenic or saprophyte bacteria such as *Mycobacterium smegmatis*, *Gordonia neofelificis* and *Rhodococcus jostii*. The most important advances in this field have been achieved in the study of cholesterol catabolism, largely due to the role of this molecule in the pathogenesis of *M. tuberculosis*. However, actinobacteria usually contain several gene clusters involved in the steroid catabolism, which confer on them the ability to mineralize a wide range of steroids (e. g., sterols, bile acids, testosterone, progesterone). The complexity of the steroid molecules and consequently of their degradation processes makes the study of these pathways especially difficult.

On the other hand, microbial biocatalysts have been used for decades to facilitate the synthesis of new steroid molecules in the pharmaceutical industry (Donova and Egorova, 2012). For this purpose, different environmentally isolated microorganisms improved by means of conventional random mutation and selection techniques have been traditionally used in biotransformation processes. However, it has recently begun to explore the implementation of Metabolic Engineering and Synthetic Biology approaches for the development of improved biocatalysts à la carte. In this way, in recent years there has been a convergence of interests between the study of steroid catabolic pathways and the design of biocatalysts à la carte for industrial purposes. This Doctoral Thesis is part of this new experimental approach.

2. Objectives and results

Two general objectives were proposed at the beginning of this Doctoral Thesis:

1. Investigate the steroid catabolism in the bacterium *M. smegmatis*, which has been proposed as a metabolic model for the study of cholesterol catabolism in actinobacteria.
2. Investigate the potential of *M. smegmatis* as a microbial cell factory for the production of steroids of industrial interest.

In relation to the first objective of this Doctoral Thesis, the mineralization of the C-19 steroids

androst-4-ene-3,17-dione (AD), androst-1,4-diene-3,17-dione (ADD) and 9 α -hydroxy-4-androstene-3,17-dione (9OH-AD), postulated as intermediates of the cholesterol catabolism in actinobacteria, has been studied in *M. smegmatis*. Contrary to what might be expected, this bacterium cannot use the C-19 compounds as the sole carbon and energy source. Only the $\Delta kstR$ mutant, which constitutively expresses the cholesterol catabolic genes regulated by the KstR repressor, metabolizes AD and ADD with certain difficulties, but not 9OH-AD, suggesting that these compounds are not true intermediates of the cholesterol catabolic pathway. From these studies, different mutants of *M. smegmatis* metabolizing efficiently all the C-19 steroids were identified mapped in the *MSMEG_2868* gene, which encodes a PadR-type regulator. These mutants constitutively express a group of genes called C-19+ cluster (*MSMEG_2851* to *MSMEG_2901*), which encodes different steroid metabolizing enzymes that remain essentially inactive under conventional culture conditions. These genes are responsible for the mineralization of C-19 steroids in the PadR mutants. The C-19+ cluster have apparently evolved independently from the upper cholesterol *kstR*-regulon, but both clusters converge on the lower cholesterol *kstR2*-regulon responsible for the metabolism of the C and D steroid rings. Homologous C-19+ clusters have been identified in other actinobacteria that metabolize steroids, but remarkably it is absent in *M. tuberculosis*. The identification of this new gene cluster has allowed the discovery of new enzymatic activities of industrial interest (e. g., 3-keto-steroid- Δ^1 -dehydrogenase, KstD; 3-ketoesteroid-9 α -hydroxylase, KSH) and has opened the door to design of more robust biocatalysts for the steroid production.

In relation to the second objective, the previous knowledge has been applied to the utilization of *M. smegmatis* as a microbial cell factory for the steroid production. The use of this model bacterium has been investigated in three processes of industrial relevance: (i) production of 9 α -hydroxy-4-androstene-3,17-dione from sterols, (ii) production of testosterone, (iii) $\Delta^1,2$ -dehydrogenation and 9 α -hydroxylation of 3-ketoesteroids. The results obtained have provided the proofs of concept that support the use of *M. smegmatis* as an ideal biocatalyst for the implementation of Metabolic Engineering and Synthetic Biology in the development of industrial bioprocesses for the production of steroids à la carte.

3. Conclusions

- It is necessary to reformulate the catabolism of sterols in actinobacteria and in particular, in *M. smegmatis*. The results support the hypothesis that the steroid side-chain and the A-B rings degradation occurs simultaneously during the sterol catabolism and therefore the compounds AD, ADD or 9OH-AD are not true intermediates of the cholesterol catabolic pathway.
- A new C-19 steroid catabolic pathway named the C-19+ pathway has been identified in *M. smegmatis*, converging with the cholesterol pathway on the *kstR2*-regulon. The "*padR*-regulon" (or "C-19+regulon"), regulated transcriptionally by the PadR repressor (*MSMEG_2868*), encodes a set of enzymes that catalyze the A-B rings modification of C-19 steroids and is localized in a genomic region called the C-19+ cluster.
- Homologous C-19+ clusters have been annotated in different actinobacteria species (e. g., *R. jostii* RHA1, *G. neofelifaecis* NRRL B-59395, *N. simplex* VKM Ac-2033D), but remarkably they

are absent in pathogenic actinobacteria such as *M. tuberculosis*. The C-19+ cluster are also not present in the industrial mycobacterial strains *M. neoaurum* VKM Ac-1815D and *Mycobacterium* sp. NRRL B-3805.

- *M. smegmatis* has been shown to be a microbial cell factory suitable for the production of steroid compounds of interest (e. g, 9OH-AD, testosterone) from natural sterols by Metabolic Engineering approaches.
- It has been demonstrated the importance of properly selecting enzymes KstD and KSH to optimize industrial biotechnological processes that present $\Delta^{1,2}$ -dehydrogenation and 9 α -hydroxylation reactions of 3-keto-steroids.

4. References

Donova, M. V. y Egorova, O. V. (2012). Microbial steroid transformations: current state and prospects. *Appl Microbiol Biotechnol* **94**: 1423-47.

García, J. L., Uhía, I. y Galán, B. (2012). Catabolism and biotechnological applications of cholesterol degrading bacteria. *Microb Biotechnol* **5**: 679-99.

Lednicer, D. (2011). Steroid chemistry at a glance. Wiley, Chichester.

Nelson, D. L. y Cox, M. M. (2012). Lehninger principles of biochemistry. 6th edition. New York, WH Freeman.

II. RESUMEN

Biotransformación bacteriana de esteroides

1. Introducción

Los compuestos de naturaleza esteroídica constituyen una familia de moléculas de gran relevancia biológica por su abundancia en la naturaleza y su participación en un amplio abanico de funciones celulares y fisiológicas en distintos organismos (Lednicer, 2011; Nelson y Cox, 2012). Desde mediados del siglo XX, se ha incrementado enormemente el número de moléculas esteroideas debido a la síntesis química de un gran número de compuestos xenobióticos con diferentes propiedades farmacológicas.

El estudio de las rutas microbianas de degradación de esteroides ha despertado un gran interés en la comunidad científica en las últimas décadas, impulsado por la abundancia de esteroides naturales y el aumento considerable de contaminantes xenobióticos esteroideos en el medio ambiente (García *et al.*, 2012). Un número considerable de estos estudios se han realizado con Actinobacterias (Actinomicetos) y en particular, con representantes del suborden Corynebacterineae tales como *Mycobacterium*, *Rhodococcus* y *Gordonia*. Estos géneros incluyen bacterias patógenas como por ejemplo *Mycobacterium tuberculosis* o *Rhodococcus equi*, y bacterias o saprófitas o patógenas no-estrictas como por ejemplo *Mycobacterium smegmatis*, *Gordonia neofelificis* y *Rhodococcus jostii*. Los avances más importantes en este campo se han logrado en el estudio del catabolismo del colesterol, debido en gran medida al papel de esta molécula en la patogénesis de *M. tuberculosis*. Sin embargo, las actinobacterias normalmente contienen varios *clusters* génicos implicados en el catabolismo de esteroides, que les confieren la capacidad de mineralizar un amplio rango de esteroides (p. ej., esteroides, ácidos biliares, testosterona, progesterona). La complejidad de las moléculas esteroideas y por consiguiente de sus procesos de degradación, hace que el estudio de estas rutas sea especialmente difícil.

Por otro lado, en la industria farmacéutica se han utilizado desde hace décadas biocatalizadores microbianos para facilitar la síntesis de nuevas moléculas esteroideas (Donova y Egorova, 2012). Para este propósito, tradicionalmente se han utilizado en procesos de biotransformación distintos microorganismos aislados del medio ambiente mejorados mediante técnicas convencionales de mutación al azar y selección. Sin embargo, recientemente se ha comenzado a explorar la implementación de aproximaciones de Ingeniería Metabólica y Biología Sintética para el desarrollo de biocatalizadores mejorados a la carta. De esta manera, en los últimos años se ha producido una convergencia de intereses entre el estudio de las rutas de catabolismo de esteroides y el diseño de biocatalizadores a la carta con fines industriales. Esta Tesis Doctoral se encuadra dentro de esta nueva aproximación experimental.

2. Objetivos y resultados

Al inicio de esta Tesis Doctoral, se propusieron dos objetivos fundamentales:

1. Investigar el catabolismo de esteroides en la bacteria *M. smegmatis*, que ha sido propuesta como modelo metabólico para el estudio del catabolismo del colesterol en actinobacterias.

2. Investigar el potencial de *M. smegmatis* como biofactoría celular para la producción de esteroides de interés industrial.

En relación al primer objetivo de esta Tesis Doctoral, se ha estudiado en *M. smegmatis* la mineralización de los esteroides C-19 androst-4-en-3,17-diona (AD), androst-1,4-dien-3,17-diona (ADD) y 9 α -hidroxi-4-androsten-3,17-diona (9OH-AD), que han sido postulados como intermediarios del catabolismo del colesterol. En contra de lo que cabría esperar, se ha observado que esta bacteria no puede utilizar los compuestos C-19 como única fuente de energía y carbono. Sólo el mutante $\Delta kstR$, que expresa constitutivamente los genes del catabolismo del colesterol regulados por el represor KstR, metaboliza el AD y el ADD con ciertas dificultades, pero no el 9OH-AD, sugiriendo que estos compuestos no son verdaderos intermediarios de la ruta del colesterol. A partir de estos estudios se identificaron diferentes mutantes de *M. smegmatis* en el gen *MSMEG_2868*, que codifica un regulador tipo PadR, que metabolizan eficientemente todos los esteroides C-19. Estos mutantes en PadR expresan constitutivamente un grupo de genes denominado *cluster* C-19+ (*MSMEG_2851* a *MSMEG_2901*), que codifica distintas enzimas metabolizadoras de esteroides que permanecen esencialmente inactivas bajo condiciones de cultivo convencionales. Estos genes son los responsables de la metabolización de esteroides C-19 en los mutantes en PadR. El *cluster* C-19+ aparentemente ha evolucionado independientemente del regulón *kstR* del colesterol, pero ambos convergen en el regulón *kstR2* responsable del metabolismo de los anillos C y D de los esteroides. Se han identificado *clusters* C-19+ homólogos en otras actinobacterias que metabolizan esteroides, pero notablemente este *cluster* está ausente en *M. tuberculosis*. La identificación de este nuevo *cluster* génico ha permitido el descubrimiento de nuevas actividades enzimáticas de interés industrial (p. ej., 3-cetoesteroide- Δ^1 -deshidrogenasa, KstD; 3-cetoesteroide-9 α -hidroxilasa, Ksh) y ha abierto la puerta al diseño de biocatalizadores celulares más robustos para la producción de esteroides.

En relación al segundo objetivo, se ha estudiado la aplicación de los conocimientos anteriores para utilizar *M. smegmatis* como biofactoría celular en la producción de esteroides. Para ello, se ha investigado el uso de esta bacteria modelo en tres procesos de relevancia industrial: (i) producción de 9 α -hidroxi-4-androsten-3,17-diona a partir de esteroides, (ii) producción de testosterona, (iii) $\Delta^1,2$ -deshidrogenación y 9 α -hidroxilación de 3-cetoesteroides. Los resultados obtenidos han aportado las pruebas de concepto que apoyan la utilización de *M. smegmatis* como un biocatalizador ideal para la implementación de metodologías de Ingeniería Metabólica y Biología Sintética en el desarrollo de bioprocesos industriales para la producción de esteroides a la carta.

3. Conclusiones

- Es necesario reformular el catabolismo de esteroides en actinobacterias y en particular, en *M. smegmatis*. Los resultados apoyan la hipótesis de que la degradación de la cadena lateral de los esteroides y las modificaciones químicas introducidas en los anillos A/B del núcleo esteroideo ocurren simultáneamente durante el catabolismo de esteroides y por tanto, los compuestos AD, ADD o 9OH-AD no son verdaderos intermediarios de estas rutas.
- Se ha identificado una nueva ruta catabólica denominada ruta C-19+ involucrada en el catabolismo

de esteroides C-19 en *M. smegmatis*, que converge con la ruta catabólica de esteroides a nivel del regulón *kstR2*. El “regulón *padR*” (o “regulón C-19+”), regulado transcripcionalmente por el represor PadR (*MSMEG_2868*), codifica un conjunto de enzimas que catalizan la modificación de los anillos A/B de los esteroides C-19 y se localiza en una región genómica denominada *cluster* C-19+.

- Se han anotado *clusters* C-19+ homólogos en distintas especies de actinobacterias (p. ej., *R. jostii* RHA1, *G. neofelifaecis* NRRL B-59395, *N. simplex* VKM Ac-2033D), pero excepcionalmente están ausentes en algunas actinobacterias patógenas como por ejemplo *M. tuberculosis*. El *cluster* C-19+ tampoco está presente en las cepas industriales *M. neoaurum* VKM Ac-1815D y *Mycobacterium* sp. NRRL B-3805.
- Se ha demostrado que la bacteria *M. smegmatis* es una biofactoría celular adecuada para la producción de compuestos esteroideos de interés (p. ej., 9OH-AD, testosterona) a partir de esteroides naturales mediante aproximaciones de Ingeniería Metabólica.
- Se ha demostrado la importancia de seleccionar adecuadamente las enzimas KstD y KSH para optimizar procesos biotecnológicos industriales que incluyen reacciones de $\Delta^{1,2}$ -deshidrogenación y 9 α -hidroxilación de 3-cetoesteroides.

4. Referencias

Donova, M. V. y Egorova, O. V. (2012). Microbial steroid transformations: current state and prospects. *Appl Microbiol Biotechnol* **94**: 1423-47.

García, J. L., Uhía, I. y Galán, B. (2012). Catabolism and biotechnological applications of cholesterol degrading bacteria. *Microb Biotechnol* **5**: 679-99.

Lednicer, D. (2011). Steroid chemistry at a glance. Wiley, Chichester.

Nelson, D. L. y Cox, M. M. (2012). Lehninger principles of biochemistry. 6th edition. New York, WH Freeman.

III. INTRODUCCIÓN

La presente Tesis Doctoral con título “Biotransformación bacteriana de esteroides” se incluye en el área de la Biotecnología Microbiana. Por ello, en el primer bloque de esta Introducción, se explicarán generalidades de las moléculas esteroideas y de las rutas de degradación de esteroides conocidas. En el segundo bloque, se introducirán conceptos generales de Biotecnología y se comentarán algunas de las tareas más relevantes en las que se ha visto inmersa la Biotecnología de Esteroides en las últimas décadas.

1. Introducción al mundo de los esteroides

1.1. Conceptos generales de esteroides:

1.1.1. Definición y funciones biológicas de los esteroides naturales

Los esteroides son compuestos orgánicos de la familia de los terpenoides, también conocidos con el nombre de isoprenoides (Fig. 1). Esta familia incluye más de 50.000 compuestos naturales que desempeñan múltiples funciones biológicas en distintos organismos: hormonas, fitohormonas, reguladores de la fluidez de la membrana celular, pigmentos, componentes de aceites esenciales, mediadores de mecanismos de comunicación y defensa en plantas, entre otras.

Los terpenoides se sintetizan biológicamente siguiendo un patrón modular que consta de cuatro etapas: (i) producción de los monómeros C-5 isopentenil-pirofosfato (IPP) y dimetilalil-pirofosfato (DMAPP), (ii) polimerización de un número variable de monómeros C-5, (iii) ciclación y/o reordenamiento del polímero por la acción de enzimas terpeno sintasas específicas, (iv) decoración enzimática de la molécula para la producción de un compuesto final bioactivo. En la actualidad, muchos terpenoides (p. ej., taxol, artemisina, coenzima Q10, licopeno, hormonas esteroideas, escualeno, isopreno, etc.) poseen un gran interés por sus múltiples aplicaciones en las industrias farmacéutica, alimentaria, cosmética o petroquímica (Chang y Keasling, 2006; Ajikumar *et al.*, 2008).

Todos los esteroides presentan una estructura química común derivada del esqueleto de ciclopentanoperhidrofenantreno (también denominado gonano o esterano), que consta de 17 átomos de carbono organizados en cuatro anillos fusionados: los anillos A, B y C presentan seis átomos de carbono y el anillo D presenta cinco átomos (Fig. 2). Las propiedades químicas y fisiológicas de cada molécula esteroidea dependen del estado de oxidación de los anillos y de la posición, tipo, número y posiciones (estereo- y regio-específicas) de los grupos funcionales que presenta. Por ejemplo, la presencia de un grupo hidroxilo en posición C-11 β es crucial para la actividad antiinflamatoria, el grupo hidroxilo en posición C-17 β confiere propiedades androgénicas y la aromatización del anillo A determina la actividad biológica de los estrógenos (JCBN, 1989; Lednicer, 2011).

Los esteroides son una familia de esteroides de 27-29 átomos de carbono, que presentan un grupo hidroxilo y una cadena lateral de ocho o más átomos de carbono en las posiciones C-3 y C-17 del núcleo esteroideo, respectivamente. Estos compuestos actúan como agentes estabilizantes de las membranas celulares en eucariotas: animales (colesterol), vegetales (fitoesteroides) y hongos (ergosterol) (Nelson y Cox, 2012). Recientemente se ha identificado un grupo reducido de especies bacterianas que también sintetizan esteroides (p. ej., lanosterol) para regular la fluidez y otras propiedades de sus membranas (Pearson *et al.*, 2003; Lamb *et al.*, 2007). Entre ellas, destacan las mixobacterias, que pueden sintetizar distintos esteroides o distintas combinaciones de los mismos dependiendo la especie.

Por otra parte, Wei *et al.* (2016) publicaron un estudio filogenético que sugiere que la producción de esteroides puede ser un fenómeno frecuente en muchas otras especies bacterianas.

El colesterol es un esteroide de gran relevancia biológica, que presenta 27 átomos de carbono y un grupo hidroxilo en configuración β en el C-3 (Fig. 1, 2). Esta molécula es esencial para los animales, ya que además de sus funciones estructurales en las membranas celulares, es el precursor inmediato de las hormonas esteroideas, ácidos biliares y vitamina D (Miller, 1988; Björkhem y Eggertsen, 2001). Los mamíferos no requieren ingerir colesterol en la dieta, ya que todas sus células pueden sintetizarlo *de novo*. De hecho, la cantidad total de colesterol en el organismo (absorbida de la dieta y sintetizada *de novo*) suele sobrepasar los niveles fisiológicos requeridos, de manera que una parte del mismo tiene que ser excretada o transformada en otros compuestos esteroideos (ácidos biliares u hormonas esteroideas) (Björkhem y Eggertsen, 2001).

Las hormonas esteroideas de los mamíferos se sintetizan a partir del colesterol y se clasifican en cinco grandes familias: mineralocorticoides, glucocorticoides, andrógenos, estrógenos y progestágenos (Fig. 1, 2). Presentan múltiples funciones fisiológicas, controlando diversos aspectos de la proliferación celular y diferenciación de tejidos y regulando la transducción de señales mediante la unión a receptores intracelulares específicos, que actúan como factores de transcripción modulando la expresión génica. Los mineralocorticoides y glucocorticoides se sintetizan en la corteza de la glándula adrenal, mientras que las hormonas sexuales (andrógenos, estrógenos y progestágenos) se producen en las gónadas y/o en la placenta. En todos los casos, la síntesis de estas hormonas conlleva la eliminación de carbonos de la cadena lateral del colesterol y la introducción de varias hidroxilaciones. Los mineralocorticoides (p. ej., aldosterona) controlan la reabsorción de iones inorgánicos (Na^+ , Cl^- y HCO_3^-), mientras que los glucocorticoides (p. ej., cortisol) regulan el metabolismo de proteínas, grasas y carbohidratos e intervienen en las respuestas inmunes, inflamatorias y alérgicas. Los progestágenos (p. ej., progesterona) regulan el ciclo reproductivo femenino y los andrógenos (p. ej., testosterona) y estrógenos (p. ej., estradiol) determinan el desarrollo de los caracteres sexuales secundarios masculinos y femeninos.

Los ácidos biliares son compuestos de 24 átomos de carbono dihidroxilados o trihidroxilados, que derivan del colesterol (Fig. 1, 2). Frecuentemente se encuentran conjugados a glicina y taurina formando el grupo de los ácidos biliares secundarios (p. ej., ácidos taurocólico y glicólico derivados del ácido cólico). Las sales biliares son sales sódicas o potásicas de los ácidos biliares secundarios y forman parte de la bilis, que participan en la emulsión de las grasas durante la digestión y favorecen la absorción de vitaminas liposolubles (Nelson y Cox, 2012).

Por otra parte, la vitamina D3 o colecalciferol (Fig. 1, 2) es un derivado esteroideo que presenta múltiples funciones biológicas: incrementa la absorción de calcio y fósforo en el intestino, aumenta los niveles de calcio en los riñones y huesos, reduce la producción de hormona paratiroidea (PTH) y modula el sistema inmune por su rol inmunosupresor, promotor de la fagocitosis y antitumoral. Esta vitamina se sintetiza en la piel a partir del 7-deshidrocolesterol en una reacción fotoquímica catalizada por la luz ultravioleta solar. Posteriormente tiene que ser doblemente hidroxilada en el hígado y en los riñones para generar la forma activa de la hormona (1,25-dihidroxicolecalciferol) (Nelson y Cox, 2012).

Por último, hay que mencionar el posible papel de ciertos esteroides en diversos mecanismos de señalización celular. Numerosos microorganismos presentes en los epitelios humanos utilizan pequeñas moléculas similares a las hormonas esteroideas en procesos de comunicación celular (*quorum sensing*) (Miller y Bassler, 2001; Waters y Bassler, 2005). Más allá, la señalización entre distintos reinos, es decir, entre los microorganismos y sus hospedadores eucariotas, puede también tener lugar de manera bidireccional a través de moléculas esteroideas de este tipo. De hecho, estos compuestos parecen alterar

la expresión de determinados genes de virulencia en la bacteria y la transducción de señales en los mamíferos. El conocimiento de estos mecanismos puede ser importante para comprender la etiología de muchas enfermedades, inclusive enfermedades multifactoriales como los trastornos inflamatorios crónicos y el cáncer (Hughes y Sperandio, 2008; Antunes *et al.* 2011).

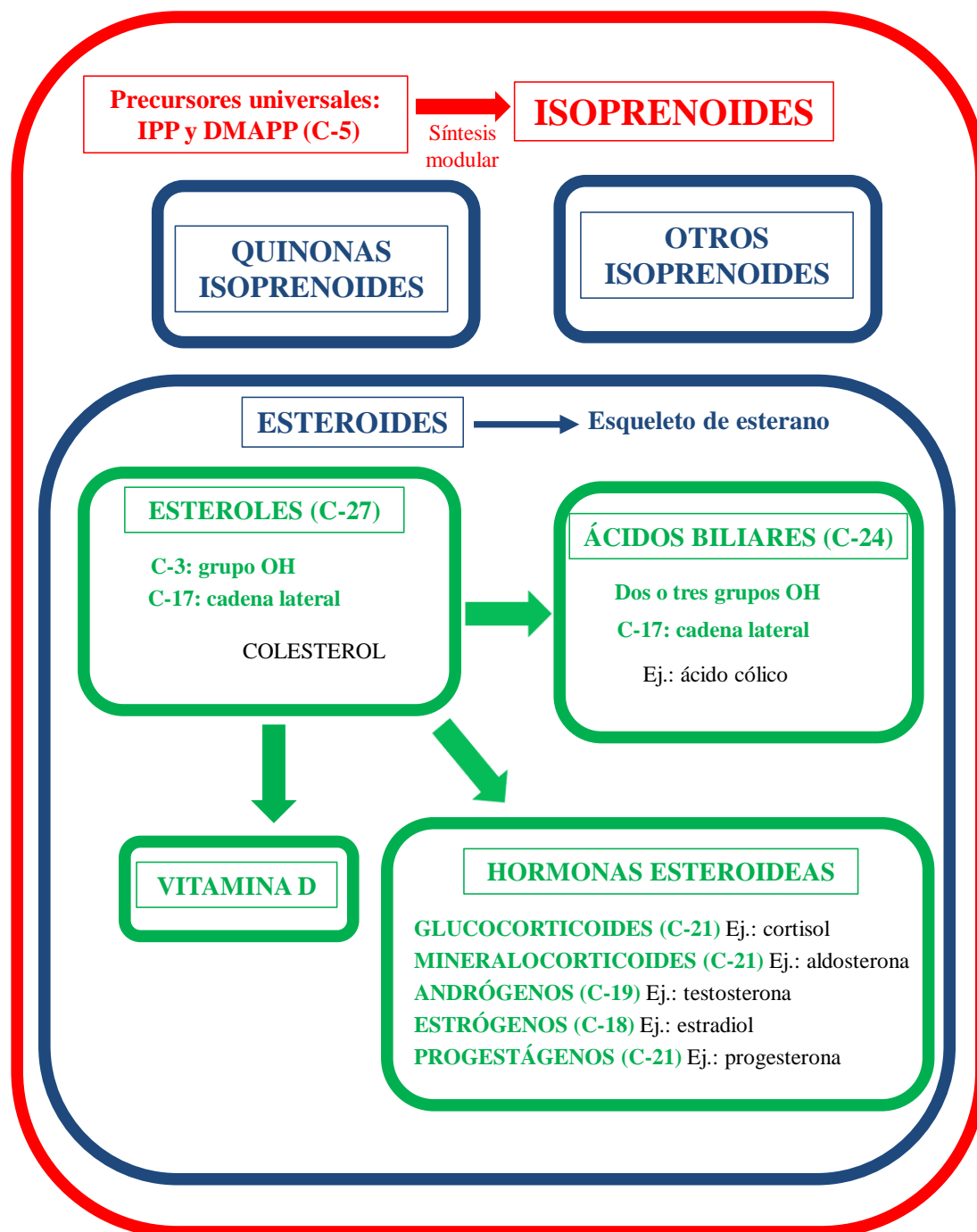


Figura 1. Clasificación de los esteroides más relevantes sintetizados en mamíferos. Los terpenoides, también conocidos con el nombre de isoprenoides, son sintetizados siguiendo un patrón modular a partir de los precursores universales C-5 isopentenil-pirofosfato (IPP) y dimetilalil-pirofosfato (DMAPP). Los mamíferos sintetizan diversos tipos de isoprenoides como por ejemplo determinadas quinonas y esteroides. Estos últimos presentan una estructura química común derivada del esqueleto de esterano y de acuerdo a su función biológica se pueden clasificar en cuatro grandes familias: esteroides, ácidos biliares, hormonas esteroideas y vitamina D. En mamíferos todos los esteroides se sintetizan a partir del colesterol.

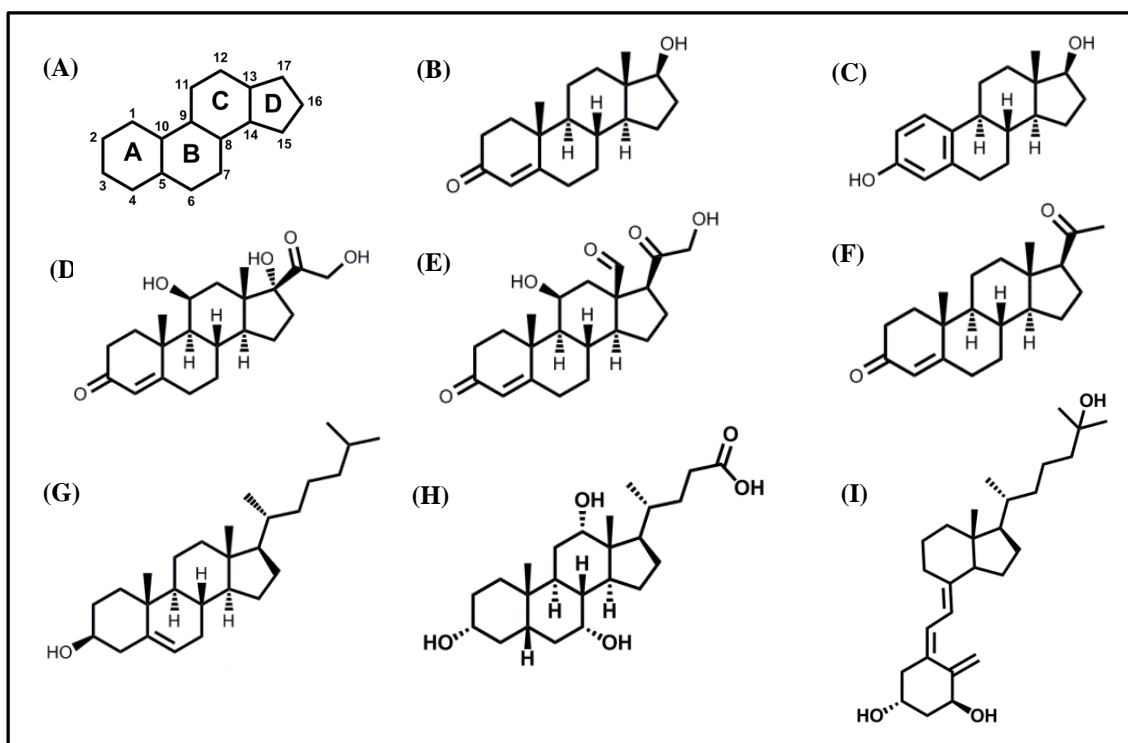


Figura 2. Estructuras químicas de diversos esteroides de relevancia biológica. (A) Ciclopentanoperhidrofenantreno, esterano o gonano. (B) Testosterona. (C) Estradiol. (D) Cortisol o hidrocortisona. (E) Aldosterona. (F) Progesterona. (G) Colesterol. (H) Ácido cólico. (I) Vitamina D3 o calcitriol.

1.1.2. Los esteroides como contaminantes ambientales

En el medio ambiente se puede encontrar una gran cantidad de compuestos esteroideos en forma libre que proceden de distintas fuentes naturales. Sin embargo, en las últimas décadas se han detectado en algunos ecosistemas esteroides que pueden ser considerados como contaminantes ambientales. Estos esteroides proceden de vertidos de explotaciones industriales o de efluentes municipales que contienen productos farmacéuticos. De hecho, los productos farmacéuticos y los productos para el cuidado personal (PPCPs), entre los que se incluyen diversas moléculas esteroideas, se han clasificado recientemente como una clase emergente de contaminantes que afectan especialmente a los medios acuáticos (Gagné *et al.*, 2006; Chang *et al.*, 2011). Dado que muchos de estos compuestos esteroideos poseen potentes actividades metabólicas y/o celulares, su presencia y/o acumulación en determinados nichos ecológicos puede causar efectos perjudiciales sobre la salud humana y alterar los ciclos biológicos de otras especies. Por ejemplo, se considera que la acumulación en medios acuáticos del anticonceptivo sintético 17 α -etinilestradiol y de otros estrógenos naturales (17 β -estradiol y estrona) procedentes de aguas residuales, es responsable de la feminización de peces macho (Daughton y Ternes, 1999), descrita por vez primera a mediados de los años 80 en unas lagunas de tratamiento de aguas residuales (Routledge *et al.*, 1998). Los estrógenos presentes en el medio ambiente derivan también, aunque en menor medida, de residuos de estiércol procedentes de ganado y aves de corral (Hanselman *et al.*, 2003; Raman *et al.*, 2004). Estos residuos son también considerados una fuente importante de testosterona ambiental (Lee *et al.*, 2003).

Por otra parte, los efluentes derivados del lavado de la lana son calificados por la legislación europea como altamente contaminantes (Directiva 85/377/CEE). Estos efluentes presentan un contenido

importante de colesterol y otros esteroides relacionados que son bastante resistentes a la degradación. Precisamente por este alto índice de persistencia, el colesterol y otros derivados primarios, son utilizados como biomarcadores de referencia en algunos análisis de contaminación medioambiental. Por ejemplo, el coprostanol es considerado un marcador de contaminación fecal (Veiga *et al.*, 2005).

1.1.3. Los esteroides como principios activos farmacológicos

Actualmente numerosos fármacos de tipo esteroideo son utilizados como agentes antitumorales, antiinflamatorios, antimicrobianos (antivirales, antifúngicos, antibacterianos, etc.), anticonvulsivos y antialérgicos. Otros se utilizan en la prevención y tratamiento de enfermedades como por ejemplo el cáncer hormona-dependiente de mama o próstata, la obesidad, la diabetes, la artritis reumatoide, la hipertensión, el asma, el eczema, las inflamaciones, los trastornos metabólicos, las enfermedades neurodegenerativas en ancianos, o ciertas enfermedades del sistema nervioso central (Demain, 1992; Sedlacek y Leland, 1988). Sus múltiples aplicaciones explican el hecho de que los esteroides sean uno de los productos farmacéuticos más comercializados, representando la categoría de fármacos más vendida después de los antibióticos (Tong y Dong, 2009). Su producción anual actual se estima en más de un millón de toneladas con un mercado de miles de millones de euros (Bureik y Bernhardt, 2007; Žnidaršič-Plazl y Plazl, 2010). En estos momentos, ya se han aprobado alrededor de 300 fármacos esteroideos para su uso en clínica y este número tiende a crecer en los próximos años. Aunque la mayor parte de estos principios activos se sintetizan químicamente, la industria farmacéutica conoce desde hace décadas el potencial de las biotransformaciones microbianas en este campo. Estos aspectos serán explicados más detalladamente en el Apartado 2 de esta Introducción.

De manera específica, se mencionará brevemente el papel clínico de dos fármacos esteroideos que son de relevancia en la presente Tesis Doctoral: la testosterona y los glucocorticoides. La testosterona (TS) es una hormona sexual del grupo de los andrógenos, que promueve efectos fisiológicos androgénicos y anabolizantes. Aunque su uso clínico ha estado ligado principalmente a terapias de reemplazo hormonal en hombres con hipogonadismo, también puede ser administrada en otros tipos de trastornos. Por otro lado, los glucocorticoides son hormonas que participan en la regulación del metabolismo de carbohidratos, grasas y proteínas y además, presentan actividades inmunosupresoras y antiinflamatorias, entre otras. El cortisol o hidrocortisona es un glucocorticoide natural muy utilizado como agente antiinflamatorio y/o inmunosupresor en el tratamiento de múltiples enfermedades. Otros glucocorticoides sintéticos como la prednisona y la prednisolona son también muy útiles en aplicaciones clínicas.

1.2. Degradación bacteriana de esteroides:

El estudio de las rutas de degradación de esteroides ha despertado un gran interés en la comunidad científica en los últimos dos siglos (s. XX-XXI), impulsado por el aumento considerable de contaminantes esteroideos en el medio ambiente y el potencial clínico de muchos de estos compuestos y sus derivados. A continuación, se introducirá brevemente la diversidad bacteriana (Apartado 1.2.1.) y las rutas de degradación de esteroides descritas hasta el momento en bacterias (Apartado 1.2.2.).

1.2.1. Análisis de la diversidad bacteriana

En este apartado únicamente se mencionarán bacterias que degradan totalmente distintos tipos de esteroides y en ningún caso otros microorganismos que sólo presentan actividades enzimáticas modificadoras de esteroides. Como se muestra en la Tabla 1, las bacterias degradadoras de esteroides identificadas hasta el momento pertenecen a los filos Actinobacteria y Proteobacteria:

	Bacteria	Características	Referencias
Actinobacteria	Mycobacterium <i>M. tuberculosis</i> H37Rv <i>M. smegmatis</i> mc ² 155 <i>M. neoaurum</i> ATTC 25795	Crecimiento aeróbico en esteroides	(Ouellet <i>et al.</i> , 2011; García <i>et al.</i> , 2012; Yao <i>et al.</i> , 2013)
	Rhodococcus <i>R. jostii</i> RHA1 <i>R. erythropolis</i> SQ1 <i>R. rhodochrous</i> DSM43269 <i>R. ruber</i> str. Chol-4	Crecimiento aeróbico en esteroides, ácidos biliares y otros compuestos esteroideos (p. ej., testosterona, progesterona, DHEA o 7-cetoesterol)	(van der Geize <i>et al.</i> , 2007, 2011; Fernández de las Heras <i>et al.</i> , 2009; Mathieu <i>et al.</i> , 2010; Petrusma <i>et al.</i> , 2011; Mohn <i>et al.</i> , 2012; Haußmann <i>et al.</i> , 2013)
	Gordonia <i>G. cholesterolivorans</i> <i>G. neofelifaecis</i>	Crecimiento aeróbico en esteroides. Crecimiento en andrógenos (p. ej., AD) dependiente de cepa	(Drzyzga <i>et al.</i> , 2011; Li <i>et al.</i> , 2014)
β-Proteobacterias	Sterolibacterium <i>St. desnitrificans</i>	Crecimiento aeróbico y anaeróbico en colesterol y ciertos andrógenos (p. ej., TS)	(Tarlera y Denner., 2003; Wang <i>et al.</i> , 2014)
	Comamonas <i>C. testosteroni</i> TA441 <i>C. testosteroni</i> CNB-2	Crecimiento aeróbico en testosterona y en otros compuestos esteroideos (p. ej., progesterona, epiandrosterona, DHEA, ácidos biliares)	(Sih <i>et al.</i> , 1965; Sih y Whitlock, 1968; Horinouchi <i>et al.</i> , 2004b, 2010, 2012)
γ-Proteobacterias	Steroidobacter <i>S. denitrificans</i> DSMZ18526	Crecimiento anaeróbico en esteroides androgénicos (p. ej., TS)	(Leu <i>et al.</i> , 2011; Yang <i>et al.</i> , 2016)
	Pseudomonas <i>Pseudomonas</i> sp. str. Chol1 <i>Pseudomonas putida</i> . str. DOC21	Crecimiento aeróbico en ácido cólico y sus derivados	(Philipp <i>et al.</i> , 2006; Merino <i>et al.</i> , 2013; Barrientos <i>et al.</i> , 2015)
α-Proteobacterias	Sphingomonas <i>Sphingomonas</i> str. KC8	Degradación aeróbica de 17β-estradiol, estrona y testosterona	(Roh y Chu, 2010)
	Novosphingobium <i>N. tardagens</i> <i>Novosphingobium</i> sp. str. Chol11	Degradación aeróbica de 17β-estradiol y ácido cólico	(Fujii <i>et al.</i> , 2002, 2003; Yücel <i>et al.</i> , 2016)

Tabla 1. Clasificación taxonómica de las bacterias que degradan esteroides. Se muestran los principales géneros de bacterias degradadoras de esteroides, así como una breve descripción de sus características catabólicas y algunas referencias bibliográficas relevantes.

1.2.1.1. Actinobacterias

El filo de las Actinobacterias (Actinomycetos) está formado por bacterias Gram-positivas con un alto contenido en GC. Muchas de estas bacterias poseen diversos sistemas enzimáticos activos frente a esteroides. De hecho, por primera vez, en 1913 se aislaron especies del género *Mycobacterium* capaces de utilizar colesterol como única fuente de carbono y energía (Söhngen, 1913). En años posteriores, diferentes autores aislaron numerosas cepas bacterianas pertenecientes a los géneros *Nocardia*, *Arthrobacter*, *Brevibacterium*, *Corynebacterium*, *Streptomyces* o *Microbacterium*, entre otras, capaces de degradar total o parcialmente diversos esteroides (Tak, 1942; Brown y Peterson, 1966; Arima *et al.*, 1969; Nagasawa *et al.*, 1969; Chipley *et al.*, 1975; Martin, 1977; Ferreira y Tracey, 1984). Muchas de estas especies han sido reclasificadas en los últimos años. Por ejemplo, este es el caso de *Nocardia restrictus* ATCC 14887 y *Brevibacterium sterolicum* ATCC 21387, actualmente consideradas cepas de *Rhodococcus equi* (Goodfellow y Alderson, 1977; Ladrón *et al.*, 2003).

El catabolismo de esteroides en actinobacterias ha sido fundamentalmente estudiado en representantes del suborden Corynebacterineae, tales como *Mycobacterium*, *Rhodococcus* y *Gordonia*, que son conocidos con el nombre de bacterias ricas en ácidos micólicos por presentar un alto contenido de estos ácidos grasos en su envuelta celular. Estos géneros incluyen bacterias patógenas como por ejemplo *M. tuberculosis*, *Mycobacterium bovis*, *Mycobacterium leprae* o *R. equi*, y bacterias saprófitas de vida libre (no patógenas u oportunistas) como por ejemplo *M. smegmatis*, *M. neoaurum*, *G. neofelifaecis* y *R. jostii*. En los últimos años se han realizado importantes avances en el estudio del catabolismo del colesterol en actinobacterias, debido en gran medida a la importancia de esta ruta catabólica en la patogénesis de *M. tuberculosis* (Pandey y Sassetti, 2008). Otros estudios también han confirmado que el catabolismo del colesterol puede ser clave en la patogénesis de otras actinobacterias como *R. equi* (van der Geize *et al.*, 2011). Debido a las dificultades experimentales que supone la manipulación de cepas patógenas, se han realizado un gran número de estudios en bacterias modelo como *M. smegmatis* o *R. jostii* (García *et al.*, 2012).

Por otra parte, también se ha sido estudiado la degradación de otros compuestos esteroideos en algunas especies de actinobacterias (p. ej., ácidos biliares o testosterona) (van der Geize *et al.*, 2007; Fernández de las Heras *et al.*, 2009; Mathieu *et al.*, 2010; Petrusma *et al.*, 2011; Mohn *et al.*, 2012; Haußmann *et al.*, 2013). En determinadas actinobacterias se han identificado distintos *clusters* de degradación de esteroides que presentan patrones de expresión/inducibilidad y especificidades de sustrato diferentes. Por ejemplo, en *R. jostii* RHA1 se han identificado cuatro *clusters* génicos involucrados en la degradación de esteroides: *cluster 1* (colesterol) (*ro04531-ro04705*), *cluster 2* (*ro02478-ro02492*), *cluster 3* (ácido cólico) (*ro05788-ro05832*) y *cluster 4* (*ro09002-ro09040*), éste último presente en el plásmido pRHL1 (van der Geize *et al.*, 2007; Mathieu *et al.*, 2010; Mohn *et al.*, 2012; Haußmann *et al.*, 2013). La función biológica de algunos de estos *clusters* aún no está clara y su distribución parece estar restringida a determinadas especies de actinobacterias (Bergstrand *et al.*, 2016).

Por último, otros ejemplos de actinobacterias que metabolizan esteroides son los géneros *Nocardioides* o *Tsukamurella*, que se incluyen en el suborden Propionibacterineae (Kreit y Sampson, 2009). Aunque no existe mucha información disponible en estos momentos, nuevos datos también sugieren que la capacidad de degradar esteroides está distribuida en otros géneros de actinobacterias. En este sentido, la utilización de aproximaciones *in silico* y el aislamiento de bacterias de nuevos nichos ecológicos (p. ej., marinos) será clave para la identificación de estas nuevas especies degradadoras de esteroides (Bergstrand *et al.*, 2016).

1.2.1.2. Proteobacterias

El filo de las Proteobacterias está formado por bacterias Gram-negativas con un bajo contenido en GC. Entre sus representantes se han identificado distintas especies degradadoras de esteroides que pertenecen a las clases α -, β - y λ -proteobacterias.

La degradación de testosterona (TS) ha sido fundamentalmente estudiada en *C. testosteroni*. Esta bacteria, que también es capaz de degradar otros compuestos (p. ej., progesterona, DHEA, ácidos biliares), presenta dos *clusters* génicos para la degradación de esteroides. Utilizando diversos mutantes de disrupción génica se ha demostrado que muchos de los genes que intervienen en la modificación del núcleo esteroideo son comunes en la degradación de los distintos esteroides, de manera que existe una única ruta catabólica que es además similar a las descritas en actinobacterias (Horinouchi *et al.*, 2001, 2003a, 2003b, 2004a, 2004b, 2005, 2006, 2008, 2010, 2012, 2014a, 2014b).

Por otra parte, se han aislado numerosas especies de *Pseudomonas* capaces de mineralizar ácidos biliares (Philipp *et al.*, 2006; Merino *et al.*, 2013; Barrientos *et al.*, 2015) y varias especies de los géneros *Sphingomonas* sp. y *Novoshingobium* sp. que metabolizan estrógenos aeróbicamente (Fujii *et al.*, 2002, 2003; Roh y Chu., 2010). Recientemente, también se han identificado proteobacterias desnitrificantes que degradan anaeróbicamente diversos tipos de andrógenos como por ejemplo *Sterolibacterium denitrificans* (*St. denitrificans*) y *Steroidobacter denitrificans* (*S. denitrificans*) (Fahrbach *et al.*, 2010; Chiang *et al.*, 2008a; Leu *et al.*, 2011; Wang *et al.*, 2013b, 2014; Yang *et al.*, 2016). Parece ser que la metabolización de estos compuestos tiene lugar través de una ruta catabólica alternativa que no requiere de O₂ y que por tanto, difiere en algunas etapas de las rutas catabólicas aeróbicas antes mencionadas. Más allá, la bacteria *St. denitrificans* utiliza la misma ruta catabólica para la degradación anaeróbica del colesterol (Wang *et al.*, 2013b, 2014). Curiosamente, hasta el momento, sólo se han identificado dos bacterias gram-negativas capaces de mineralizar el colesterol a dióxido de carbono (Harder y Probian, 1997; Tarlera y Denner, 2003).

1.2.2. Catabolismo bacteriano de esteroides

1.2.2.1. Degradación aeróbica del colesterol

El catabolismo aeróbico del colesterol ha sido estudiado en detalle en distintas actinobacterias modelo (p. ej., *M. tuberculosis*, *M. smegmatis* mc²155 o *R. jostii* RHA1). La combinación de múltiples estudios en distintas especies ha permitido determinar la mayor parte de las etapas bioquímicas de la ruta, así como otros aspectos relevantes de la misma como el transporte de esteroides o la regulación transcripcional (Martin, 1977; Owen *et al.*, 1983; Kieslich, 1985; Sedlacek y Leland, 1988; Szentirmai, 1990; Ouellet *et al.*, 2011; Griffin *et al.*, 2012; García *et al.*, 2012). En 2007, por primera vez, se identificó mediante análisis transcriptómicos la presencia de un *cluster* génico involucrado en la degradación del colesterol en *R. jostii* RHA1 (van der Geize *et al.*, 2007). Este *cluster* génico se encuentra conservado en otras especies de actinobacterias como por ejemplo *M. tuberculosis* H37Rv, *M. bovis* Calmette-Guérin y *Mycobacterium avium* (van der Geize *et al.*, 2007).

A. Transporte de colesterol

El *cluster* de genes del catabolismo del colesterol incluye un sistema complejo de transporte de tipo ABC codificado por el denominado operón *mce4*, cuya función ha sido determinada en *R. jostii* RHA1

(Mohn *et al.*, 2008), *M. tuberculosis* (Pandey y Sassetti, 2008) y *M. smegmatis* (Klepp *et al.*, 2012) (Fig. 3). Este operón se encuentra únicamente presente en Actinobacterias y contiene diez genes denominados *yrbE4ABmce4ABCDEFmas4AB*. Los dos primeros genes del operón codifican las permeasas del sistema y el resto de genes de función desconocida codifican posiblemente las proteínas de unión al sustrato (Casali y Riley, 2007). La actividad ATPasa del sistema es suministrada por una enzima codificada por el gen *mceG* que se encuentra localizado en otra parte del genoma en *M. tuberculosis* y es compartida con otros sistemas Mce presentes en la célula (Joshi *et al.*, 2006). La razón por la cual los sistemas Mce requieren de más proteínas que los transportadores ABC clásicos no está clara, pero se ha sugerido que estas proteínas forman parte de un complejo necesario para el movimiento de sustratos hidrofóbicos a través de la pared celular de Actinobacterias (Song *et al.*, 2008).

Mohn *et al.* (2008) demostraron que los mutantes de *R. jostii* RHA1 en el locus *mce4* son incapaces de transportar y crecer en colesterol como única fuente de carbono y energía, ni en otras moléculas estructuralmente similares que presentan una cadena lateral de 8 o más átomos de carbono en el C-17. En cambio, estos mutantes crecen normalmente en compuestos esteroideos con cadenas laterales más cortas y/o polares (p. ej., ácido cólico o progesterona) o en compuestos sin cadena lateral (p. ej., AD), lo que sugiere una especificidad de los transportadores Mce4 por algunos esteroides. También se ha demostrado que la presencia del transportador Mce4 es esencial para la supervivencia de *M. tuberculosis* en macrófagos durante tiempos de infección prolongados (Sassetti y Rubin, 2003; Joshi *et al.*, 2006). Los mutantes de *M. tuberculosis* en los genes *yrbE4A* (permeasa A del operón *mce4*) y *mceG* (ATPasa) presentan un escaso crecimiento en colesterol y una virulencia disminuida en modelos animales. Sin embargo, se ha observado que en estos mutantes el crecimiento en colesterol se recupera a tiempos largos, lo que sugiere la existencia de otro sistema de transporte secundario o pasivo en la bacteria (Pandey y Sassetti, 2008).

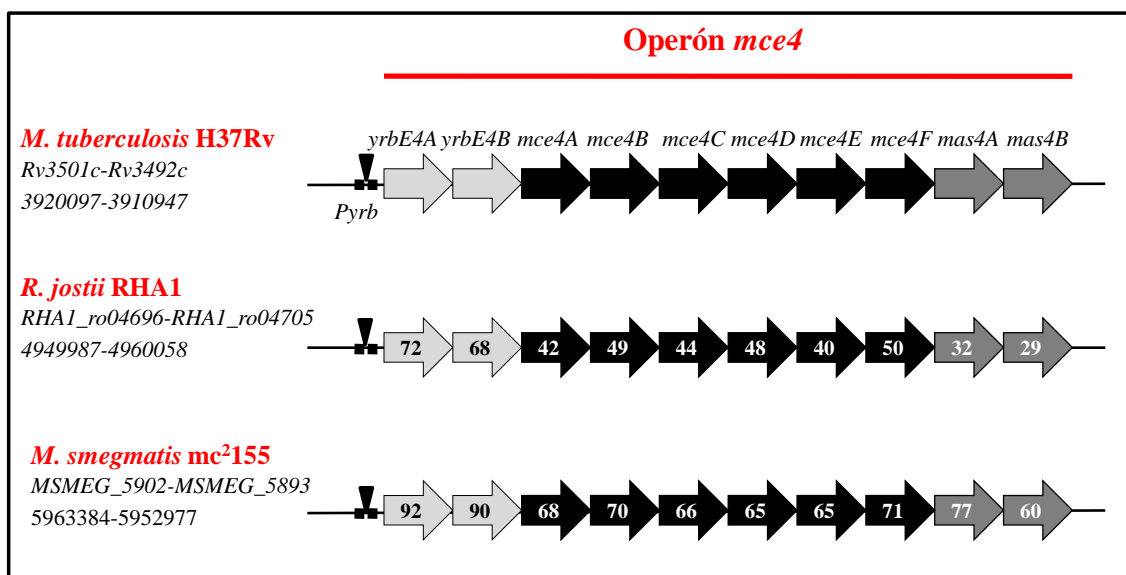


Figura 3. Representación esquemática del operón *mce4* de *M. tuberculosis* H37Rv, *R. jostii* RHA1 and *M. smegmatis* mc²155. Se ha calculado la identidad proteica (%) de cada elemento utilizando como referencia las proteínas homólogas de *M. tuberculosis* H37Rv. En las zonas promotoras (*P_{yrb}*) se representa la secuencia operadora reconocida por el represor KstR (triángulo) y las cajas promotoras -10 y -35 (cuadrados).

B. Ruta metabólica de degradación del colesterol

La ruta de degradación del colesterol tradicionalmente se ha subdividido en tres partes: ruta alta, ruta central y ruta baja. A continuación, se detallan las principales etapas bioquímicas:

(i) Ruta alta del catabolismo del colesterol

La primera etapa de la ruta catabólica del colesterol es la oxidación e isomerización del colesterol a 4-colesten-3-ona (colestenona). Según el tipo de bacteria, esta reacción puede ser catalizada por proteínas colesterol oxidasas (ChOx) (Li *et al.*, 1993; Yue *et al.*, 1999; Coulombe *et al.*, 2001; Navas *et al.*, 2001; Lario *et al.*, 2003; Brzostek *et al.*, 2007; Drzyzga *et al.*, 2011; Fernández de las Heras *et al.*, 2011) y/o 3- β -hidroxi- Δ^5 -esteroide deshidrogenasas/isomerasas (3 β -HSD) (Horinouchi *et al.*, 1991; Yang *et al.*, 2007; Uhía *et al.*, 2011a; Brzostek *et al.*, 2013), que presentan doble actividad enzimática: la actividad 3 β -hidroxiesteroide oxidasa/deshidrogenasa favorece la oxidación del grupo OH del C-3 y la actividad Δ^5 -3-cetoesteroide isomerasa interviene en la isomerización del doble enlace (Fig. 4). Las ChOx bacterianas son enzimas extracelulares de la familia glucosa-metanol-colina oxidorreductasa, que utilizan FAD y O₂ como cofactor y aceptor de electrones, respectivamente. Las enzimas 3 β -HSD forman parte de la superfamilia SDR y utilizan NAD(P)⁺ como aceptor de electrones. En el género *Mycobacterium* esta reacción es normalmente catalizada por enzimas 3 β -HSDs. Por ejemplo, en *M. smegmatis* mc²155 existen dos actividades 3 β -HSD mayoritarias que son codificadas por los genes *MSMEG_5228* y *MSMEG_5233* (Uhía *et al.*, 2011a; Brzostek *et al.*, 2013).

De manera simultánea o posterior a la formación de colesteno, se inicia la oxidación de la cadena lateral del colesterol (Fig. 4). En primer lugar, dos citocromos P450 denominados CYP125 y CYP142, catalizan la hidroxilación del C-27 y la oxidación posterior del producto hidroxilado a (25S)-3-oxocolest-4-en-26-oato (compuesto VI) vía un intermediario aldehído (compuesto V). Esta reacción enzimática se ha estudiado en detalle en las bacterias *M. tuberculosis*, *M. smegmatis* y *R. jostii* RHA1 (Capyk *et al.*, 2009a; McLean *et al.*, 2009; Rosłonec *et al.*, 2009; Driscoll *et al.*, 2010; Johnston *et al.*, 2010; Ouellet *et al.*, 2010; García-Fernández *et al.*, 2013). También se puso cierta atención en un tercer citocromo de *M. smegmatis* (CYP125A4, *MSMEG_3524*), ya que el mutante doble $\Delta cyp125a3/\Delta cyp142a2$ de la bacteria retenía la capacidad de utilizar colesterol como única fuente de carbono y energía (García-Fernández *et al.*, 2013). A pesar de que el citocromo CYP125A4 comparte aproximadamente un 65% de identidad proteica a CYP125A3, presenta poca actividad enzimática sobre colesterol y/o colesteno en estudios *in vitro* (Frank *et al.*, 2015). En cambio, este citocromo presenta una potente actividad enzimática sobre 7 α -hidroxi-4-colesten-3-ona, sugiriendo que *M. smegmatis* podría ser capaz de utilizar otros esteroides ambientales como fuente de carbono y energía.

Después de la acción enzimática de los citocromos P450, se inicia la degradación total de la cadena lateral a través de tres ciclos consecutivos similares a los procesos de β -oxidación, que resultan en la generación de dos moléculas de propionil-CoA, un acetil-CoA y un 17-cetoesteroide (Fig. 4). Como etapa previa, se produce la activación por una molécula de CoA del grupo carboxilato de la cadena lateral (compuesto VII) catalizada por la enzima esteroide-CoA ligasa FadD19 en *R. rhodochrous* DSM 43269 (Wilbrink *et al.*, 2011). El primer ciclo de β -oxidación de la cadena lateral ha sido descrito en detalle en *M. tuberculosis*. En este primer ciclo, la enzima acil-CoA deshidrogenasa ChsE4-ChsE5 cataliza la deshidrogenación de 3-oxocolest-4-en-26-oil-CoA (compuesto VII) a 3-oxocolest-4,24-dien-26-oil-CoA (compuesto VIII) (Thomas *et al.*, 2011; Thomas y Sampson, 2013; Yang *et al.*, 2015), que es a su vez transformado a 24-hidroxi-3-oxocolest-4-en-26-oil-CoA (compuesto IX) por la acción de la enzima enoil-CoA hidratasa ChsH1-ChsH2 (Yang *et al.*, 2014). La proteína β -hidroxiacil-CoA deshidrogenasa Hsd4A de *M. tuberculosis* codificada por el gen *Rv3502c* podría estar involucrada en la siguiente etapa que genera

3,24-dioxocolest-4-en-26-oil-CoA (compuesto X) (Griffin *et al.*, 2012; Wipperman *et al.*, 2013), que es modificado por la acción de la enzima tiolasa FadA5 (esteroide acil-CoA-aciltransferasa) a 3-oxocol-4-en-24-oil-CoA (compuesto XI) liberando una molécula de propionil-CoA (Nesbitt *et al.*, 2010; Schaefer *et al.*, 2015). El segundo ciclo de la β -oxidación se inicia por la acción de la enzima acil-CoA deshidrogenasa ChsE3 y una enoil-CoA hidratasa que genera un alcohol cuaternario (Yang *et al.*, 2015). El compuesto resultante es hidratado por una enzima desconocida y posteriormente deshidrogenado por la enzima HsdA4 para producir 3,22-dioxocol-4-en-24-oil-CoA (compuesto XIV) (Xu *et al.*, 2016). Después, la enzima FadA5 tiolasa transforma el compuesto XIV en 3-oxo-pregne-20-carboxil-CoA (compuesto XV) liberando una molécula de acetil-CoA (Nesbitt *et al.*, 2010; Griffin *et al.*, 2012; Schaefer *et al.*, 2015). El tercer ciclo de la β -oxidación comienza con la deshidrogenación del compuesto XV por la acción enzimática de ChsE2-ChsE1 generando 3-oxo-4,17-pregne-20-carboxil-CoA (compuesto XVI) (Thomas *et al.*, 2011; Yang *et al.*, 2015), seguido de una reacción de enoil-CoA hidratación llevada a cabo por las proteínas ChsH2-ChsH1 (Thomas *et al.*, 2011) y una última reacción de escisión retroaldólica C1-C2' catalizada por Ltp2 que genera androst-4-en-3,17-diona (AD) (compuesto XVIII) y una molécula de propionil-CoA (Thomas *et al.*, 2011).

(ii) Ruta central del catabolismo del colesterol

El catabolismo aeróbico del colesterol ocurre a través de una ruta común en actinobacterias denominada ruta 9(10)-seco (Fig. 5). El primer intermediario de la ruta (AD) deriva de la degradación total de la cadena lateral del colesterol. Como primera etapa bioquímica, una 3-cetosteroide- Δ^1 -deshidrogenasa de baja especificidad como KsdD en *M. smegmatis* (Brzostek *et al.*, 2005) o KstD en *R. erythropolis* (van der Geize *et al.*, 2000, 2001, 2002a) y en *M. tuberculosis* (Brzostek *et al.*, 2009), cataliza la transformación de AD en 1,4-androstadien-3,17-diona (ADD). Después, se produce la 9 α -hidroxilación de ADD por la acción de una enzima 3-cetoesteroide-9 α -hidroxilasa denominada KstH en *M. smegmatis* (Andor *et al.*, 2006) o KshAB en *R. erythropolis* (van der Geize *et al.*, 2002b, 2008) y en *M. tuberculosis* (Capyk *et al.*, 2009b), que es seguida de una transformación no-enzimática del 9 α -hidroxi-1,4-androstadien-3,17-diona (9OH-ADD) en 3-hidroxi-9,10-secoandrosta-1,3,5(10)-trien-9,17-diona (3-HSA). La posterior hidroxilación de 3-HSA es catalizada por una enzima oxigenasa de dos componentes (HsaAB en *R. jostii* RHA1 y *M. tuberculosis*; Dresen *et al.*, 2010) que genera el derivado catecólico 3,4-dihidroxi-9,10-secoandrosta-1,3,5(10)-trien-9,17-diona (3,4-DHSA), que a su vez es hidroxilado por una enzima meta-extradiol dioxigenasa HsaC caracterizada en *R. jostii* RHA1 (van der Geize *et al.*, 2007) y en *M. tuberculosis* (Yam *et al.*, 2009). De este modo, tiene lugar la apertura espontánea del anillo A y se genera el ácido 4,5,9,10-diseco-3-hidroxi-5,9,17-trioxoandrosta-1(10),2-dien-4-oico (4,9-DSHA). Éste último compuesto es hidrolizado por HsaD en *M. tuberculosis* (Lack *et al.*, 2008, 2010) y en *R. jostii* RHA1 (van der Geize *et al.*, 2007), dando lugar a los ácidos 2-hidroxihexa-2,4-dienoico (HHD) y 9,17-dioxo-1,2,3,4,10,19-hexanorandrostano-5-oico (HIP).

La degradación de HHD probablemente tiene lugar por la acción de enzimas similares a las proteínas TesE, TesF y TesG descritas en *C. testosteroni* (Horinouchi *et al.*, 2005). En primer lugar, el HHD es transformado a ácido 4-hidroxi-2-oxohexanoico por la acción de la hidratasa TesE. Este compuesto es posteriormente transformado a ácido pirúvico y propionaldehído por la acción enzimática de la aldolasa TesG. El propionaldehído es finalmente transformado a ácido propiónico mediante la acción de la aldehído deshidrogenasa TesF (Horinouchi *et al.*, 2005). Los intermediarios sintetizados en estas etapas son posteriormente mineralizados a través de las rutas centrales del metabolismo bacteriano (Kieslich, 1985).

(iii) Ruta baja de catabolismo del colesterol

La degradación del compuesto HIP comienza con la degradación de su cadena lateral mediante un proceso similar a la β -oxidación (Lee *et al.*, 1967; Miclo y Germain, 1990, 1992). Para ello, en primer lugar, tiene la activación de la molécula con CoA. Recientemente se ha demostrado que la enzima acil-CoA sintetasa FadD3 cataliza dicha reacción en *R. jostii* RHA1 (Casabon *et al.*, 2013a). Otros genes como por ejemplo *fadE30* y *ipdAB* que codifican una acil-CoA transferasa y una enzima heterodimérica CoA-transferasa, respectivamente, también están involucrados en la degradación de HIP en *R. equi* (van der Geize *et al.*, 2011). El resto de las etapas bioquímicas de degradación de los anillos C y D no han sido demostradas hasta la fecha.

C. Regulación transcripcional

En la actualidad se conoce la existencia de dos reguladores transcripcionales que reprimen el catabolismo del colesterol (KstR y KstR2). Estos represores pertenecen a la familia de reguladores transcripcionales TetR y se han estudiado en las actinobacterias modelo *M. smegmatis*, *M. tuberculosis* y *R. jostii* RHA1 (Kendall *et al.*, 2007, 2010; Uhía *et al.*, 2011a, 2012).

Por un lado, el represor KstR controla la expresión de 83 genes catabólicos en *M. smegmatis* y 74 genes en *M. tuberculosis* (regulón *kstR*), implicados en el transporte y degradación del colesterol (zona alta y central), así como su propia expresión (Kendall *et al.*, 2007; Uhía *et al.*, 2011b, 2012). Se ha identificado la secuencia operadora reconocida por KstR (secuencia palindrómica TnnAACnnGTTnnA) (Uhía *et al.*, 2011b) y se ha demostrado que el ácido 4-colesten-3-ona-26-oico activado con CoA actúa como efector (3OChA-CoA) (García-Fernández *et al.*, 2014; Ho *et al.*, 2016). También se ha determinado la estructura cristalográfica del represor KstR libre y en complejo con metabolitos esteroideos (Ho *et al.*, 2016).

Por otro lado, se ha demostrado que el represor KstR2 regula la expresión de 15 genes catabólicos relacionados con la ruta baja del catabolismo del colesterol en *M. smegmatis* y *M. tuberculosis*, así como su propia expresión (regulón *kstR2*). Se ha determinado una secuencia operadora consenso reconocida por KstR2 en ambas bacterias (AAnCAAGnnCTTGnTT) (Kendall *et al.*, 2010; García-Fernández *et al.*, 2015) y se han identificado varios compuestos activados con CoA que podrían actuar como inductores de la ruta baja: HIP-CoA, 5 α -hidroxi-HIP-CoA (5OH-HIP-CoA) o un derivado posterior de este compuesto en la ruta catabólica (Casabon *et al.*, 2013b; García-Fernández *et al.*, 2015). También se ha determinado recientemente la estructura cristalográfica de KstR2 de *M. tuberculosis* en complejo con HIP-CoA, revelando que cada subunidad del dímero acomoda una molécula de HIP-CoA (Crowe *et al.*, 2015).

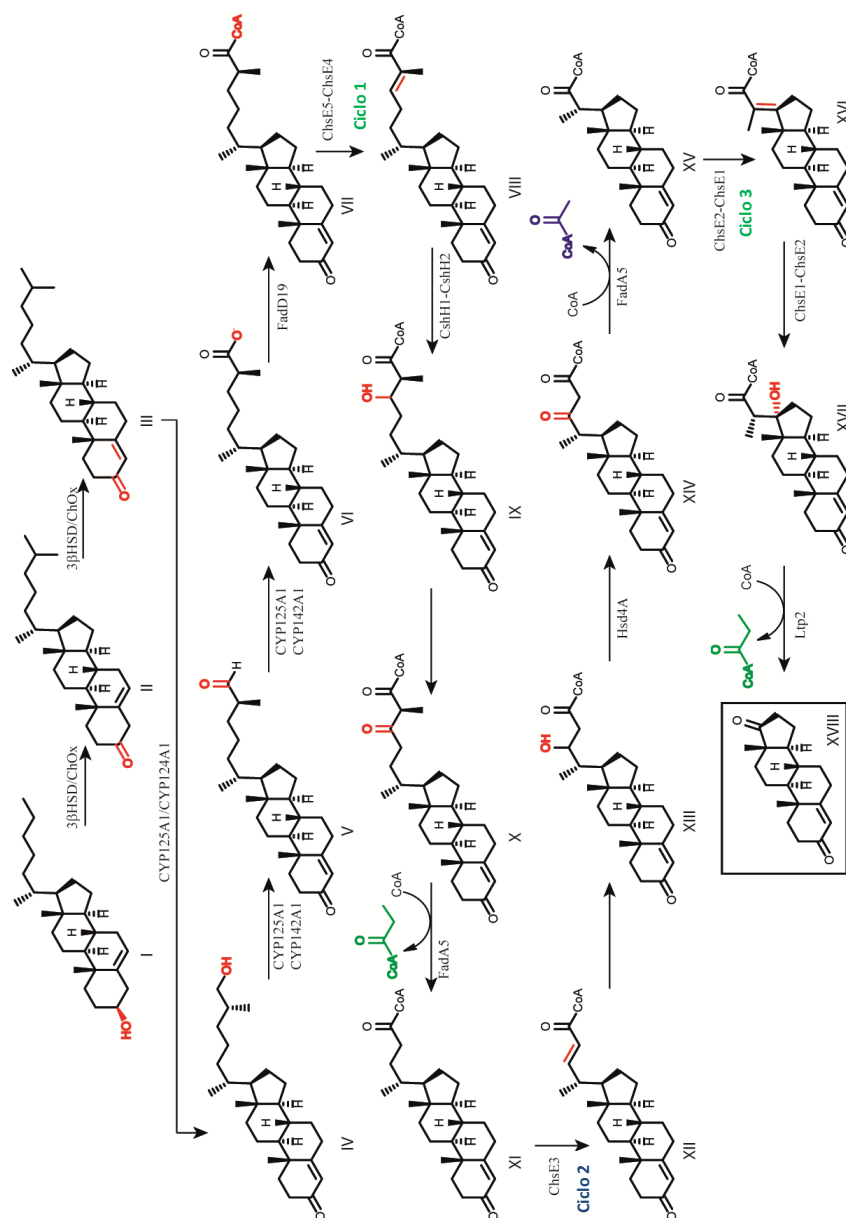
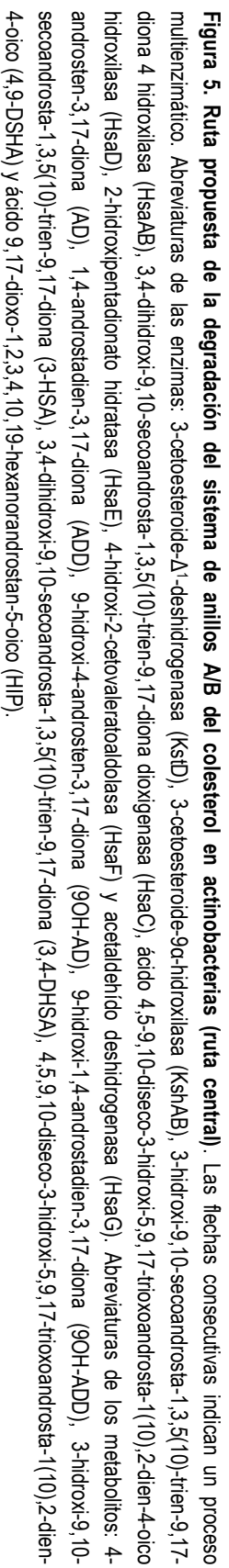


Figura 4. Ruta alta de degradación del colesterol propuesta en actinobacterias. El anillo A del colesterol es oxidado por una 3 β -deshidrogenasa (3 β -HSD) y/o una colesterol oxidasa (ChOx). Los citocromos P450 CYP125 y CYP142 inician la degradación de la cadena lateral del colesterol generando un ácido carboxílico que es activado por la enzima acil-CoA ligasa FadA19 a través de una esterificación con CoA. La cadena lateral es degradada a través de tres ciclos de β -oxidación que generan una molécula de acetil-CoA (rojo), dos moléculas de propionil-CoA (azul) y una molécula de 4-androsten-3,17-diona (metabolito XVIII, AD). Metabolitos: (I) colesterol, (II) colest-5-en-3-ona, (III) colest-4-en-3-ona, (IV) 3-oxocolest-4-en-26-ol, (V) (25S)-3-oxocolest-4-en-26-ol-CoA, (VI) (25S)-3-oxocolest-4-en-26-ol-CoA, (VII) 3-oxocolest-4,24-dien-26-ol-CoA, (IX) 24-oxocolest-4-en-26-ol-CoA, (X) 3,24-dioxocolest-4-en-26-ol-CoA, (XI) 3-oxocolest-4-en-24-ol-CoA, (XII) 3-oxocolest-4,22-dien-24-ol-CoA, (XIII) 22-hidroxi-3-oxocolest-4-en-24-ol-CoA, (XIV) 3,22-dioxocolest-4-en-24-ol-CoA, (XV) 3-oxo-4-pregnane-20-carboxil-CoA, (XVI) 17-hidroxi-3-oxo-4-pregnane-20-carboxil-CoA, (XVII) 17-hidroxi-3-oxo-4-pregnane-20-carboxil-CoA.



1.2.2.2. Degradación anaeróbica del colesterol

La degradación aeróbica del colesterol está bien caracterizada, pero mucho menos es conocido sobre su degradación en ausencia de oxígeno (Ismail y Chiang, 2011). Las reacciones anaeróbicas del colesterol más estudiadas son transformaciones parciales a coprostanol llevadas a cabo por bacterias intestinales (Li *et al.*, 1995; Freier *et al.*, 1994). Sin embargo, hasta nuestro conocimiento, ninguna de estas bacterias es capaz de mineralizar completamente el colesterol o el coprostanol.

Hasta el momento sólo se han descrito dos bacterias desnitrificantes del grupo de las β -proteobacterias, las cepas 72Chol y *St. denitrificans*, capaces de mineralizar el colesterol a dióxido de carbono en condiciones anaeróbicas, siendo la cepa *St. denitrificans* utilizada como bacteria modelo de trabajo (Harder y Probian, 1997; Tarlera y Denner, 2003). Esta bacteria es capaz de crecer en colesterol como única fuente de carbono y energía en condiciones estrictamente anaeróbicas utilizando nitrato como aceptor final de electrones (Tarlera y Denner, 2003).

Muchas de las etapas bioquímicas del catabolismo del colesterol en actinobacterias son catalizadas por enzimas oxigenasas que necesitan oxígeno molecular. La bacteria *St. denitrificans* metaboliza el colesterol de manera anaeróbica a través de una ruta 2,3-seco alternativa (en lugar de 9,10-seco), que también es utilizada para la degradación de diversos andrógenos como por ejemplo la testosterona (ver Apartado 1.2.2.3.) (Wang *et al.*, 2013b, 2014). Esto es posible gracias a la existencia de varias etapas de hidroxilaciones sin precedentes que utilizan una molécula de agua como donador de átomos de oxígeno (Chiang *et al.*, 2007, 2008a, 2008b; Dermer y Fuchs, 2012; Wang *et al.*, 2013b) y algunos otros pasos que difieren de la ruta de degradación aeróbica clásica que se detallan a continuación.

La primera etapa de la ruta catabólica propuesta es catalizada por una enzima deshidrogenasa bifuncional (AcmA) que promueve la oxidación de colesterol a colest-5-en-3-ona y su posterior isomerización a colestenona (Chiang *et al.*, 2008a). La proteína AcmA es similar a las enzimas 3β -HSD descritas en el catabolismo aeróbico en actinobacterias (Fig. 4). A continuación, una enzima colestenona- Δ^1 -deshidrogenasa (AcmB) cataliza la oxidación de colestenona a colest-1,4-dien-3-ona (Chiang *et al.*, 2008b). La activación posterior de este sustrato tiene lugar a través de la hidroxilación del C-25 de la cadena lateral catalizada por una enzima dependiente de molibdeno que utiliza una molécula de agua como donadora de átomos de oxígeno (Chiang *et al.*, 2007; Dermer y Fuchs, 2012). Esta enzima presenta una función análoga a los citocromos P450 descritos en actinobacterias (Fig. 4). Una vez que la cadena lateral ha sido degradada, el intermediario C-19 generado es posiblemente activado a través de la adición de una molécula de agua al doble enlace C1-C2 (Wang *et al.*, 2013b) y tras varias modificaciones enzimáticas que aún no han sido demostradas el intermediario sería completamente mineralizado (Wang *et al.*, 2013, 2014). Otro aspecto relevante en el que difieren estas bacterias es el sistema de transporte de colesterol. Lin *et al.* (2015) postularon que en *St. denitrificans* el colesterol es transportado a través de una proteína transmembrana (similar a FadL) hasta el espacio periplásmico, donde tendrían lugar las primeras etapas bioquímicas de la ruta catabólica.

Por último, resulta importante indicar que algunos autores han sugerido que en esta bacteria existe una única ruta catabólica para la degradación de esteroides en presencia y/o ausencia de oxígeno por varias evidencias (Chiang *et al.*, 2008a; Wang *et al.*, 2013b, 2014). En primer lugar, algunas de las enzimas que intervienen en la ruta catabólica son activas en presencia de oxígeno en ensayos *in vitro*. En segundo lugar, se han observado patrones de proteínas solubles similares en células inducidas con colesterol en presencia y/o ausencia de oxígeno. Estas hipótesis requieren de una confirmación y además, son necesarios estudios adicionales para identificar en detalle esta ruta catabólica de esteroides.

1.2.2.3. Degradación bacteriana de otros esteroides

A. Degradación de sales biliares

Las sales biliares son compuestos muy abundantes en la naturaleza que pueden ser metabolizados por muchas bacterias Gram-positivas (p.ej., *R. jostii* RHA1) (Mohn *et al.*, 2012; Swain *et al.*, 2012; Somalinga y Mohn, 2013) y Gram-negativas (p.ej., *C. testosteroni*, *Pseudomonas* sp. str. Chol1) (Birkenmaier *et al.*, 2007; Horinouchi *et al.*, 2008, 2014a; Rösch *et al.*, 2008; Philipp *et al.*, 2011; Holert *et al.*, 2013a, b, c, 2016; Merino *et al.*, 2013; Barrientos *et al.*, 2015; Yücel *et al.*, 2016). Estos compuestos son metabolizados a través de rutas catabólicas muy similares a las utilizadas en la degradación de esteroides. La regulación transcripcional de estas rutas y el transporte de estos compuestos no han sido apenas estudiados y deben ser aún elucidados. En este sentido, sólo se ha descrito que determinadas porinas parecen ser esenciales para el transporte de ácidos biliares en *R. jostii* RHA1 (Somalinga y Mohn, 2013).

B. Degradación de testosterona y otros derivados androgénicos

La degradación aeróbica de testosterona (TS) está bien caracterizada y ha sido fundamentalmente estudiada en la bacteria *C. testosteroni*. Presenta una estructura similar a la ruta central-baja del catabolismo aeróbico de esteroides en actinobacterias e involucra enzimas que son homólogas. Por ejemplo, las proteínas TesH (Horinouchi *et al.*, 2003a), TesA1A2 (Horinouchi *et al.*, 2004a), TesB (Horinouchi *et al.*, 2001), TesD (Horinouchi *et al.*, 2003b), TesE, TesF y TesG (Horinouchi *et al.*, 2005) son homólogas a las enzimas KstD, HsaAB, HsaC, HsaD, HsaE, HsaF y HsaG, respectivamente, descritas en actinobacterias. La organización genómica del *cluster* génico de degradación de TS y la existencia de otras actividades enzimáticas accesorias (p. ej., 3,17 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa) han sido estudiadas en detalle (Oppermann y Maser, 1996; Horinouchi *et al.*, 2004b, 2006, 2010; Zhang *et al.*, 2015). Su regulación transcripcional parece involucrar varios reguladores transcripcionales que también han sido identificados.

Por otra parte, también se ha descrito la degradación anaeróbica de andrógenos en bacterias desnitrificantes presentes en las aguas residuales como por ejemplo *St. denitrificans* y *S. denitrificans* (Fahrbach *et al.*, 2010; Chiang *et al.*, 2010; Leu *et al.*, 2011; Wang *et al.*, 2013b, 2014; Yang *et al.*, 2016). Parece ser que la metabolización de estos compuestos en *St. denitrificans* tiene lugar través de la ruta catabólica 2,3-seco propuesta para la degradación anaeróbica del colesterol (Wang *et al.*, 2013b, 2014).

C. Degradación de 17 β -estradiol y otros derivados estrogénicos

La contaminación de aguas residuales con estrógenos y sus derivados (p. ej., 17 β -estradiol, estrona, estriol, o etinilestradiol) es un tema preocupante por su potente actividad como disruptores endocrinos. Por este motivo, en los últimos años se han realizado esfuerzos importantes por identificar microorganismos o consorcios microbianos capaces de degradar estos compuestos (Fujii *et al.*, 2002, 2003; Isabelle *et al.*, 2011; Villemur *et al.*, 2013; Kurisu *et al.*, 2015; Chen *et al.*, 2016; Ma *et al.*, 2016). Por ejemplo, se han identificado varias especies de los géneros *Sphingomonas* sp. y *Novoshingobium* sp. capaces de utilizar distintos estrógenos como única fuente de carbono y energía (Fujii *et al.*, 2002, 2003; Roh y Chu, 2010). Aunque es asumido que el catabolismo aeróbico de estos compuestos es similar al de esteroides, no ha sido todavía estudiado en profundidad.

2. Biotecnología de esteroides

2.1. Definición y evolución de la Biotecnología

2.1.1. Concepto de Biotecnología

La Biotecnología incluye todas las aplicaciones tecnológicas que utilizan sistemas biológicos, organismos vivos o partes derivadas de los mismos, para hacer o modificar productos y/o procesos para usos específicos (Convención sobre la Diversidad Biológica, 1992). Aquellos procesos que utilizan microorganismos vivos o partes derivadas de los mismos se engloban dentro de una disciplina denominada Biotecnología Microbiana en la que se incluye el trabajo desarrollado en esta Tesis Doctoral.

En la actualidad, las aplicaciones biotecnológicas abarcan múltiples ámbitos de investigación: medicina, industria, agricultura, medio ambiente, bioterrorismo, etc. Por este motivo, se ha establecido una clasificación por colores de la Biotecnología que se ilustra en la Tabla 2.

Biotecnología	Ámbito de investigación	Aplicaciones genéricas
Roja	Medicina y procesos médicos	Diseño de organismos para la producción de fármacos (p.ej., antibióticos y vacunas), terapia génica, aplicación de técnicas moleculares en medicina forense
Blanca	Procesos industriales	Utilización de enzimas y organismos para la producción y/o modificación de materiales, compuestos químicos y/o energía
Verde	Procesos agrícolas	Utilización de nuevos procesos más respetuosos con el medio ambiente en agricultura, horticultura y ganadería
Azul	Procesos acuáticos y marinos	Aplicación de métodos moleculares y biológicos a organismos acuáticos
Gris	Procesos ambientales	Conservación de la biodiversidad y eliminación de contaminantes ambientales
Negra	Bioterrorismo	Actividades de lucha contra el bioterrorismo

Tabla 2. Clasificación de la Biotecnología por colores. Esta clasificación podría tener su origen en un discurso de la Dra. Rita R. Colwell (Directora de *National Science Foundation*, 2003), aunque los términos Biotecnología Verde o Roja habían sido utilizados previamente. En ocasiones puede resultar complicado clasificar ciertos procesos biotecnológicos siguiendo el esquema arriba propuesto. Por ejemplo, la producción de antibióticos o la biotecnología de esteroides que han sido tradicionalmente considerados como aplicaciones de la Biotecnología Blanca, podrían también ser incluidas como aplicaciones de la Biotecnología Roja.

2.1.2. Breve evolución histórica de la Biotecnología Microbiana

La utilización y/o manipulación de microorganismos para la obtención de productos de valor para el hombre se remonta a las primeras civilizaciones. Las primeras referencias históricas acerca de la producción de bebidas alcohólicas y alimentos fermentados (p.ej., vino, cerveza o pan) datan de los años 6000-4000 a.C. Estas actividades son consideradas por muchos autores el origen de la Biotecnología Microbiana. Los avances en los campos científico y tecnológico realizados en los siglos posteriores, permitió la introducción de mejoras notables en estas actividades y el diseño de nuevos procesos de producción más allá de la alimentación. De esta manera, en el s. XIX y principios del s. XX, se incorporaron conceptos de mejora genética clásica en los procesos industriales microbianos. En estas aproximaciones tradicionales, se identificaban los microorganismos productores de una molécula de interés o los biocatalizadores de un proceso y se mejoraban sus propiedades mediante largos procesos de mutagénesis físico-química y/o selección. Históricamente, estas estrategias han sido realmente eficientes y han permitido reducir los costes de producción de numerosos compuestos como por ejemplo la penicilina, el ácido cítrico, el glutamato o la lisina.

A finales de la década de 1980, con la llegada de la tecnología del ADN recombinante, se puso de manifiesto la idea de que los sistemas biológicos pueden ser manipulados genéticamente de una manera racional para optimizar y/o diseñar nuevos procesos biotecnológicos. De este modo, se consolida el concepto de “biofactoría celular microbiana” (*microbial cell factory*), es decir, la utilización de determinados microorganismos como pequeñas factorías para la producción de compuestos de interés. De la misma manera tiene lugar también la consolidación de la Ingeniería Metabólica, un campo de investigación multidisciplinar que aplica los principios ingenieriles de diseño y de análisis a las rutas metabólicas celulares con el objetivo de alcanzar un propósito particular (p.ej., la hiperproducción de un determinado metabolito). En estas aproximaciones generalmente se modifican los flujos metabólicos de la biofactoría celular logrando que la fuente de carbono sea preferencialmente direccionada hacia la formación de un producto de interés (aproximación “*top-down*”). También se pueden introducir otras modificaciones en las propiedades celulares de las biofactorías: nuevo rango de sustratos, producción heteróloga de compuestos, mejoras en los rendimientos y productividades, mayor tolerancia a estreses, etc. (Nielsen *et al.*, 2014). A continuación, se enumeran algunas características generales (y deseables) que debe presentar una biofactoría celular microbiana:

- Microorganismo no patógeno, preferiblemente con el estatus GRAS (*generally recognized as safe*; designación de la organización U.S. Food & Drug Administration).
- Genoma secuenciado.
- Disponibilidad de múltiples herramientas de manipulación genética.
- Crecimiento rápido en medios de cultivos baratos y sencillos. Ausencia de requerimientos nutricionales complejos.
- Alta tolerancia a diversos tipos de estreses (p.ej., oxidativo u osmótico).
- Capacidad de transportar los sustratos y/o productos de la reacción.
- Capacidad de transformar eficientemente el sustrato/s en producto/s. Ausencia de degradación y/o modificación no deseada de los sustratos y/o productos. Rendimientos altos de conversión y alta selectividad.

2.2. Introducción a la Biotecnología de Esteroides

Tradicionalmente los principios activos (API) esteroideos se han sintetizado en la industria farmacéutica por métodos químicos. Sin embargo, desde hace décadas se conoce el potencial de las biotransformaciones microbianas en este campo, ya que ofrecen dos claras ventajas: (i) modificación/funcionalización regio- y/o estereo-específica de las moléculas, (ii) múltiples reacciones consecutivas llevadas a cabo en un único proceso. Por este motivo, en las últimas décadas se han combinado etapas de síntesis química y biológica en los procesos industriales.

La síntesis de cortisona fue uno de los primeros ejemplos que demostró el potencial de la biotecnología en esta área. Tradicionalmente la síntesis de este compuesto se realizaba a partir de ácido desoxicólico en un proceso con un número elevado de etapas químicas (31 etapas), que presentaba bajos rendimientos (0,6%) y altos costes económicos (200 \$/g, 1949). La introducción de una etapa de biotransformación con *Rhizopus arrhizus* ATCC 11145 y *Aspergillus niger* ATCC 9142 en el proceso industrial, redujo notablemente el número de etapas químicas requeridas (11 etapas) y los costes de producción (1 \$/g, 1979) (Carballeira *et al.*, 2009). Otro ejemplo de aproximación combinada en la industria es la síntesis química de testosterona (TS) a partir del intermediario esteroideo AD, que es obtenido en procesos de biotransformación microbiana a partir de esteroides naturales. La producción biotecnológica de TS será abordada en el Apartado 2.2. de Resultados de esta Tesis Doctoral.

En este contexto, se entiende por Biotecnología de Esteroides cualquier aplicación tecnológica que utiliza sistemas biológicos, organismos vivos o partes derivadas de los mismos, para sintetizar y/o modificar moléculas esteroideas que presentan propiedades farmacológicas de interés. Esta disciplina, clasificada tradicionalmente dentro del ámbito de la Biotecnología Blanca o Industrial, persigue la sustitución total o parcial de los procesos químicos tradicionales de síntesis de esteroides por nuevos procesos biológicos más sencillos, rentables y menos contaminantes. Actualmente se pueden distinguir fundamentalmente tres tipos de procesos biotecnológicos en este campo: (i) producción de intermediarios esteroideos a partir de esteroides naturales, (ii) modificación y/o decoración de moléculas esteroideas, (iii) biosíntesis *de novo* de esteroides. En los próximos apartados se recoge una descripción más detallada de estos procesos que pone de relieve los aspectos estratégicos en los que se ha trabajado en la Biotecnología de Esteroides en las últimas décadas. En ningún caso se pretende realizar un análisis exhaustivo de las publicaciones, patentes y cepas microbianas descritas hasta el momento.

2.2.1. Producción microbiana de intermediarios esteroideos a partir de esteroides

Las sapogeninas (p. ej., diosgenina) han sido utilizadas en la industria química de esteroides como materia prima durante décadas. Por ejemplo, a partir de la diosgenina se sintetizaba el intermediario acetato de 16-deshidropregnenolona, que era a su vez transformado químicamente a otros compuestos (Hanson, 2005; Laveaga, 2005). En otras ocasiones, la diosgenina se modificaba por la acción microbiana generando nuevos esteroides con actividades terapéuticas (Wang *et al.*, 2007; Wang *et al.*, 2009 a, b). Sin embargo, la utilización de sapogeninas como materia prima presentaba muchos inconvenientes: altos costes, múltiples etapas, rendimientos relativamente bajos y agotamiento de recursos vegetales silvestres (Tong y Dong, 2009; Wang *et al.*, 2011). Por este motivo, progresivamente se han sustituido por diversos esteroides naturales (p. ej., fitoesteroides o el colesterol). Dado que en los últimos años se han introducido controles de calidad exhaustivos para la utilización de cualquier tipo de materia prima de origen animal, actualmente se utilizan diversos tipos de fitoesteroides (p. ej., soja, pino,

residuos de la industria papelería) en lugar de colesterol que es obtenido a partir de grasas y aceites animales (Fernandes *et al.*, 2003; Malaviya *et al.*, 2008). Los fitoesteros pueden ser modificados y/o biotransformados por distintas especies bacterianas que generan derivados esteroideos sin cadena lateral con propiedades parecidas a ciertas hormonas sexuales (Fig. 6). Estos compuestos que son en realidad intermediarios de la ruta de degradación de esteroides (p. ej., AD, ADD y 9OH-AD), son utilizados actualmente como sintonas de partida para la síntesis química de diversos fármacos esteroideos como por ejemplo, los corticoesteroides, mineralocorticoides y anticonceptivos orales.

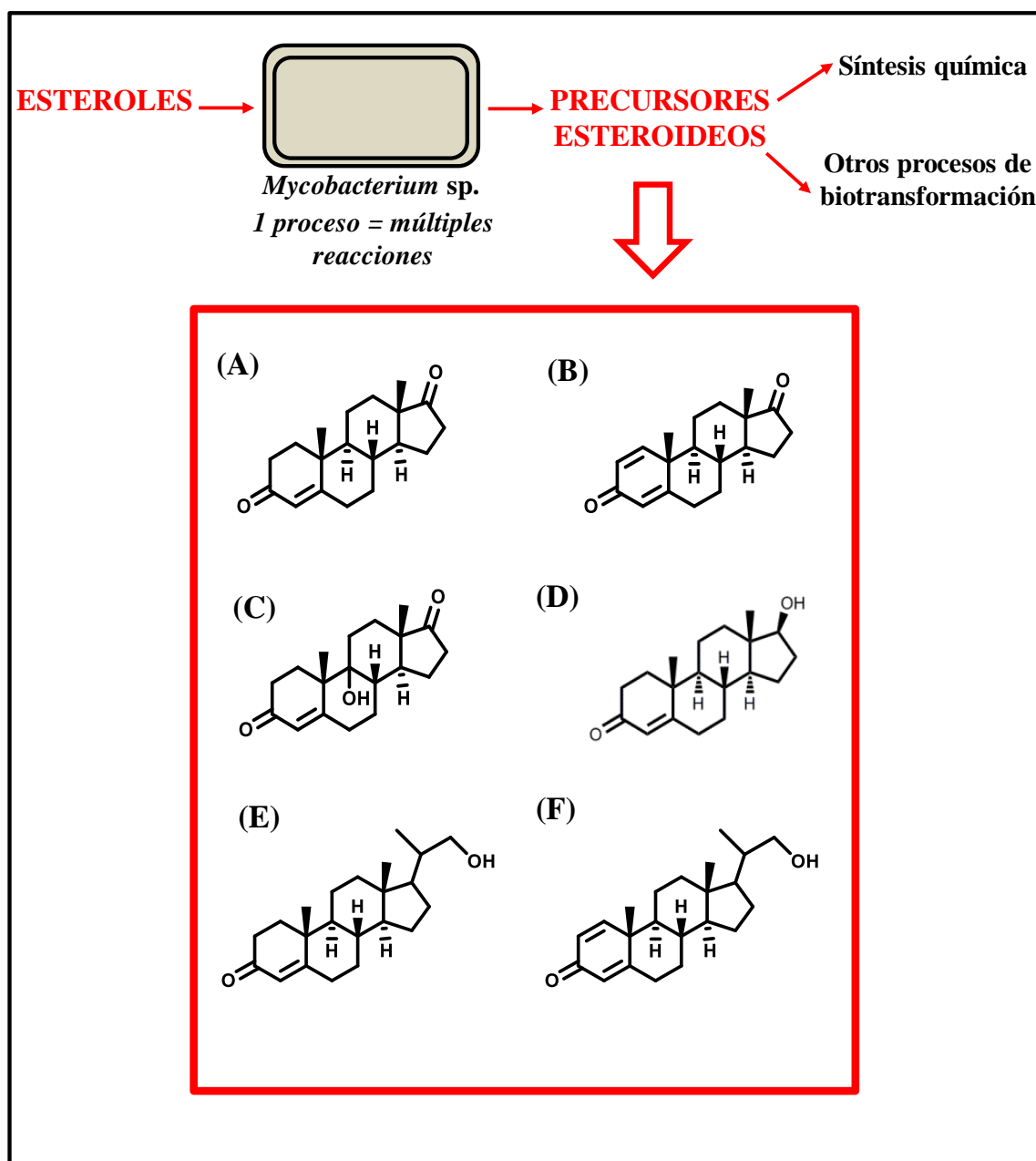


Figura 6. Representación esquemática de la producción microbiana de intermediarios esteroideos de interés (sintonas) a partir de esteroides naturales. Precursores esteroideos más comúnmente producidos a nivel industrial: (A) 4-androsten-3,17-diona (AD), (B) 1,4-androstadien-3,17-diona (ADD), (C) 9α-hidroxi-4-androsten-3,17-diona (9OH-AD), (D) testosterona (TS), (E) 22-hidroxi-23,24-bisnorcol-4-en-3-ona (4-HBC), (F) 22-hidroxi-23,24-bisnorcol-1,4-dien-3-ona (1,4-HBC).

2.2.1.1. Tipos de aproximaciones

A. Aproximaciones con tecnologías tradicionales

En las últimas décadas se han aislado y/o mejorado por mutagénesis clásica diversas cepas de micobacterias productoras de intermediarios esteroideos a partir de esteroides en una única etapa de fermentación (Tabla 3). Entre los intermediarios o sintonas producidos hasta el momento se incluyen los esteroides C-19 AD, ADD, 9-OHAD o TS y los esteroides C-22 de las series de pregnano, tales como 4-HBC (22-hidroxi-23,24-bisnorcol-4-en-3-ona) y 1,4-HBC (22-hidroxi-23,24-bisnorcol-1,4-dien-3-ona).

Microorganismo	Producto	Descripción
<i>Mycobacterium</i> sp. NRRL B- 3683	ADD	Mutagenización física de una cepa de <i>Mycobacterium</i> sp. aislada del suelo con capacidad de acumular ADD (Marsheck <i>et al.</i> , 1972)
<i>Mycobacterium</i> sp. VKM Ac-1816D	ADD	Disponible en la Colección Rusa de Microorganismos (VKM IBPM RAS)
<i>M. neoaurum</i> NwIB-01	AD/ADD	Aislamiento de cepa productora de intermediarios esteroideos en muestras de suelo (Wei <i>et al.</i> , 2010a)
<i>Mycobacterium</i> sp. NRRL B-3805	AD	Mutagenización física de <i>Mycobacterium</i> sp. NRRL B- 3683, seguido de la selección de mutantes productores de AD (Marsheck <i>et al.</i> , 1972)
<i>Mycobacterium</i> sp. VKM Ac-1815D	AD	Disponible en la Colección Rusa de Microorganismos (VKM IBPM RAS)
<i>Mycobacterium</i> sp. 2-4M	9OH-AD	Mutagenización físico-química de <i>Mycobacterium</i> sp. VKM Ac-1815D y selección de mutantes productores de 9OH-AD (Donova <i>et al.</i> , 2005a)
<i>Mycobacterium</i> sp. VKM Ac-1817D	9OH-AD	Disponible en la Colección Rusa de Microorganismos (VKM IBPM RAS) (Donova <i>et al.</i> , 2005b)
<i>Mycobacterium</i> sp. NRRL B-3805	TS	Protocolo de fermentación alternativo para favorecer la acumulación de TS como producto mayoritario (en lugar de AD) (Liu <i>et al.</i> , 1994)
<i>Mycobacterium</i> sp. ST2	TS	Mutagenización química de <i>Mycobacterium</i> sp. NRRL B-3805 y selección de mutantes productores de TS (Lo <i>et al.</i> , 2002)
<i>Mycobacterium</i> sp. VKM Ac-1816D	TS	Modificación del protocolo de fermentación para favorecer la acumulación de testosterona en lugar de ADD (Egorova <i>et al.</i> , 2009)
<i>Mycobacterium</i> sp. NRRL B- 11389	1,4-HBC	Mutagenización física de <i>M. parafortuitum</i> complex ATCC 25790 (<i>M. neoaurum</i> ATCC 25790) y selección de mutantes productores de 1,4-HBC (Imada y Takahashi, 1980)

Tabla 3. Producción microbiana de intermediarios esteroideos de interés industrial a partir de esteroides naturales mediante aproximaciones tradicionales. Se muestran varios ejemplos de microorganismos aislados y/o seleccionados por su capacidad de acumular intermediarios esteroideos a partir de esteroides. Sólo se indica el producto mayoritario obtenido al final de la fermentación y no la presencia de otros intermediarios o subproductos. Abreviaturas: ADD (1,4-androstadien-3,17-diona), AD (4-androsten-3,17-diona), 9OH-AD (9 α -hidroxi-4-androsten-3,17-diona), TS (testosterona), 1,4-HBC (22-hidroxi-23,24-bisnorcol-1,4-dien-3-ona).

B. Aproximaciones con tecnologías de ADN recombinante

En los últimos años se han realizado numerosos avances en el diseño racional de cepas productoras de precursores esteroideos de interés a partir de esteroides naturales mediante aproximaciones de Ingeniería Metabólica. Dado que estos compuestos son en realidad intermediarios de la ruta catabólica de esteroides en actinobacterias, es posible reconducir el flujo metabólico hacia su acumulación/síntesis mediante la delección y/o sobreexpresión de determinados genes (Tabla 4). El estudio de las rutas de degradación de esteroides en diversas actinobacterias modelo (van der Geize, *et al.*, 2007; Kendall *et al.*, 2007, 2012; Uhía *et al.*, 2012; Mohn *et al.*, 2012; Haußmann *et al.*, 2013; Li *et al.*, 2014), el desarrollo de nuevas herramientas de biología molecular y la secuenciación de genomas han sido claves para la consecución con éxito de estas aproximaciones.

Por ejemplo, las cepas de delección génica de *M. smegmatis* denominadas MS6039 (Δ MSMEG_6039, Δ kshB1) y MS6039-5941 (Δ MSMEG_6039 Δ MSMEG_5941, Δ kshB1 Δ kstD1) son capaces de acumular ADD y AD a partir de esteroides, respectivamente (Galán *et al.*, 2017). Del mismo modo, se han desarrollado varios mutantes de delección múltiple en la cepa silvestre *M. neoaurum* ATCC 25795 que acumulan 9OH-AD o derivados C-22 a partir de esteroides (Yao *et al.*, 2014; Xu *et al.*, 2016). Más allá, la sobreexpresión del gen *kshA* en el mutante de *M. neoaurum* productor de 9OH-AD, contribuyó notablemente a la mejora de la selectividad del proceso reduciendo la acumulación de otros subproductos no deseados (p.ej., AD) que dificultaban la posterior purificación del producto (Yao *et al.*, 2014). Por otra parte, Wei *et al.* (2010b) deleccionaron el gen *kstD* en el mutante *M. neoaurum* NwIB-01 previamente aislado de muestras de suelo, que acumulaba mezclas de AD/ADD a partir de fitoesteroides, con el objetivo de desarrollar un mutante productor de AD. Posteriormente, Wei *et al.* (2014) mejoraron la producción de ADD en la cepa NwIB-01 mediante la sobreexpresión de diversos genes *kstD* de distintos orígenes. Por último, Yuan *et al.* (2015) diseñaron una nueva cepa bacteriana productora de 9OH-AD a partir del mutante productor de AD *Mycobacterium* sp. NRRL B-3805, carente de actividad 9 α -hidroxilasa. Para ello, sobreexpresaron los genes *kshA* y *kshB* de *M. smegmatis* mc²155 y *G. neofelifaecis*, respectivamente. Por último, con el objetivo de producir 11-hidroxi-1,4-androstadien-3,17-diona (11OH-ADD) y 11-hidroxi-4-androsten-3,17-diona (11OH-AD) a partir de esteroides en una única etapa de fermentación, Felpeto-Santero (2016) sobreexpresó dos operones sintéticos que codificaban las enzimas 11 α -hidroxilasa de *Rhizopus oryzae* y 11 β -hidroxilasa de *Cochliobolus lunatus* en las cepas mutantes *M. smegmatis* MS6039 y MS6039-59410 (Galán *et al.*, 2017). Estos intermediarios, que no forman parte del catabolismo bacteriano de esteroides, son importantes precursores en la síntesis química de fármacos esteroideos.

Otros autores han intentado diseñar mutantes productores de intermediarios esteroideos a partir de esteroides en diversas especies del género *Rhodococcus*. Sin embargo, la existencia de rutas catabólicas de esteroides convergentes y de múltiples isoenzimas ha dificultado el desarrollo de mutantes establemente productores en estas especies (p. ej., Fernández de las Heras *et al.*, 2012). Hasta el momento, sólo Yeh *et al.* (2004) fueron capaces de obtener una cepa de *R. equi* productora de ADD a partir de colesterol deleccionado el gen *kshB1*. Por otra parte, Wilbrink *et al.* (2011) desarrollaron una cepa mutante de delección múltiple de *R. rhodochrous* DSM 43269 (cepa RG32) desprovista de actividad 9 α -hidroxilasa, que acumulaba mayoritariamente 1,4-BNC y pequeñas cantidades de ADD a partir de esteroides.

Microorganismo	Producto	Manipulación génica
<i>M. neoaurum</i> NwlB-01	ADD	Sobreexpresión de un gen <i>kstD</i> endógeno o de la bacteria <i>Arthrobacter simplex</i> (Wei <i>et al.</i> , 2010b; 2014)
<i>R. equi</i> USA-18	ADD	Deleción génica de <i>kshB1</i> (Yeh <i>et al.</i> , 2014)
<i>M. smegmatis</i> mc ² 155	(1) AD; (2) ADD	(1) Deleción génica de <i>kstD1</i> y <i>kshB1</i> (cepa MS6039-5941); (2) Deleción génica de <i>kshB1</i> (cepa MS6039) (Galán <i>et al.</i> , 2017)
<i>M. neoaurum</i> ATCC 25795	9OH-AD	Deleción génica múltiple de genes <i>kstD</i> y sobreexpresión del gen <i>kshA</i> (Yao <i>et al.</i> , 2014)
<i>Mycobacterium</i> sp. NRRL B-3805	9OH-AD	Sobreexpresión de los genes <i>kshA</i> y <i>kshB</i> de <i>M. smegmatis</i> mc ² 155 y <i>G. neofelificis</i> NRRL B-59395, respectivamente (Yuan <i>et al.</i> , 2015)
<i>R. rhodochrous</i> DSM43269	1,4-HBC	Deleción génica múltiple de genes <i>kshA</i> (Δ ksA12345) (Wilbrink <i>et al.</i> , 2011)
<i>M. neoaurum</i> ATCC 25795	(1) 4-HBC; (2) 1,4-HBC	(1) Deleción génica múltiple de los genes <i>kshA</i> y <i>kstD</i> (Δ <i>kstD123</i> , Δ <i>kshA12</i>) y del gen <i>hsd4A</i> ; (2) Deleción génica múltiple de los genes <i>kshA</i> (Δ <i>kshA12</i>) y del gen <i>hsd4A</i> (Xu <i>et al.</i> , 2016)
(1) MS6039-5941; (2) MS6039 (Galán <i>et al.</i> (2017))	(1) 11 α -OH-AD; (2) 11 α -OH-ADD	Sobreexpresión de un operón sintético que codifica la enzima 11 α -hidroxilasa de <i>R. oryzae</i> (Felpeto-Santero, 2016)
(1) MS6039-5941; (2) MS6039 (Galán <i>et al.</i> (2017))	(1) 11 β -OH-AD; (2) 11 β -OH-ADD	Sobreexpresión de un operón sintético que codifica la enzima 11 β -hidroxilasa de <i>C. lunatus</i> (Felpeto-Santero, 2016)

Tabla 4. Producción microbiana de intermediarios esteroideos de interés industrial a partir de esteroides naturales mediante aproximaciones con tecnologías de ADN recombinante. Se muestran varios ejemplos de cepas diseñadas por aproximaciones de Ingeniería Metabólica para producir precursores esteroideos de interés a partir de esteroides. Sólo se indica el producto mayoritario obtenido al final de la fermentación y no la presencia de otros intermediarios o subproductos. Abreviaturas: ADD (1,4-androstadien-3,17-diona), AD (4-androsten-3,17-diona), 9OH-AD (9 α -hidroxi-4-androsten-3,17-diona), 4-HBC (22-hidroxi-23,24-bisnorcol-4-en-3-ona), 1,4-HBC (22-hidroxi-23,24-bisnorcol-1,4-dien-3-ona), 11-OH-ADD (11-hidroxi-1,4-androstadien-3,17-diona), 11-OH-AD (11-hidroxi-4-androsten-3,17-diona).

2.2.2. Modificación y/o decoración microbiana de moléculas esteroideas

La utilización de biocatalizadores microbianos en los procesos de modificación y/o decoración de moléculas esteroideas resulta de gran relevancia industrial y presenta ciertas ventajas respecto a la catálisis química y/o enzimática. A continuación se describen brevemente las reacciones químicas que suscitan más interés en este campo:

2.2.2.1. Tipos de modificaciones microbianas

A. Reacciones redox (reducción-oxidación):

Las reacciones redox son reacciones químicas en las que uno o más electrones son transferidos entre dos reactivos provocando un cambio en sus estados de oxidación. Para que tenga lugar la reacción,

es necesario que un elemento ceda los electrones y otro elemento los acepte. Las oxidaciones de alcoholes, reducciones de grupos carbonilo, deshidrogenaciones de enlaces C-C o hidrogenaciones de dobles enlaces C-C, son algunos ejemplos de reacciones de reducción-oxidación. La introducción de estas modificaciones en moléculas esteroideas puede ser catalizada por enzimas específicas que requieren de la presencia de cofactores para la cesión/aceptación de electrones. Generalmente estas enzimas son deshidrogenasas reversibles que pertenecen a la superfamilia de proteínas SDR (*short-chain dehydrogenase*). La $\Delta^{1,2}$ -deshidrogenación y la 17β -reducción de 3-cetoesteroides son dos ejemplos de reacciones redox de relevancia para la industria farmacéutica y serán objeto de estudio en esta Tesis Doctoral (Resultados, Apartados 2.3. y 2.2., respectivamente).

B. Reacciones de hidroxilación:

Las hidroxilaciones son reacciones químicas de oxidación de los carbonos no activos de una molécula, es decir, reacciones en las que se reemplaza un átomo de hidrógeno por un grupo hidroxilo. Estas modificaciones químicas pueden ser catalizadas por distintos tipos de enzimas hidroxilasas como por ejemplo los citocromos P450 y las enzimas monooxigenasas de varios componentes. Actualmente las reacciones de hidroxilación de esteroides más importantes a nivel industrial probablemente son: 7α -, 9α -, 11α -, 11β -, 16α - y 17α -hidroxilación. En el Apartado 2.3 de Resultados de esta Tesis Doctoral se estudiará la 9α -hidroxilación de 3-cetoesteroides.

C. Reacciones de oxidación Baeyer-Villiger:

Las oxidaciones de Baeyer-Villiger, también denominadas reordenamientos de Baeyer-Villiger, son reacciones químicas en las que se genera un éster/lactona a partir de una cetona/cetona cíclica. Estas conversiones pueden ser catalizadas por enzimas denominadas monooxigenasas Baeyer-Villiger (BVMOs) que utilizan oxígeno molecular y NADPH (Leisch *et al.*, 2016). La producción de testolactona (inhibidor de la enzima aromatasa) a partir de ADD es un ejemplo de oxidación de Baeyer-Villiger (Kolek *et al.*, 2008).

2.2.2.2. Tipos de aproximaciones

A. Aproximaciones con tecnologías tradicionales

Tradicionalmente para la modificación de moléculas esteroideas se han utilizado microorganismos aislados del medio ambiente que presentan actividades enzimáticas constitutivas o inducibles. En la Tabla 5, se muestran algunos de los ejemplos más relevantes descritos:

Sustrato	Producto	Microorganismo
Cortisona acetato	Prednisona acetato	<i>A. simplex</i> (Zhang <i>et al.</i> , 1998)
AD	9OH-AD	<i>R. equi</i> VKM Ac- 953, <i>R. rhodochrous</i> VKM Ac-1282 (Donova, 2010)
PREG	7 α -OH-PREG	<i>Fusarium oxysporum</i> var. cubense (Reese, 2007)
DHEA	7 α -DHEA/ 7 β -DHEA	<i>Mucor racemosus</i> (Li <i>et al.</i> , 2005)
PROG	11 α -OH-PROG	<i>Rizhopus nigricans</i> ATCC 6227b (Roglič <i>et al.</i> , 2007)
PROG	11 β -OH-PROG	<i>Trichoderma harzianum</i> , <i>Trichoderma hamatum</i> (El-Kadi y Mostafa, 2004)

Sustrato	Producto	Microorganismo
TS	14 α -OH-TS	<i>Aspergillus wentii</i> MRC 200316 (Yildirim <i>et al.</i> , 2010)
(1) TS; (2) PROG	(1) 15 α -OH-TS; (2) 15 α -OH-PROG	<i>F. oxysporum</i> var. cubense (Reese, 2007)
Androsta-4,6-diene-3,17-dione	16 β -OH-androsta-4,6-diene-3,17-dione	<i>F. oxysporum</i> var. cubense UAMH 9013 (Peart <i>et al.</i> , 2011)
PROG	17 α -OH-PROG	Varias cepas de <i>Bacillus sphaericus</i> (ATCC 245, ATCC 7063, ATCC 13805, TISTR 670) y <i>A. simplex</i> ATCC 6946 (Manosroi <i>et al.</i> , 2008b)
ADD	Testololactona	<i>Purpureocillium lilacinum</i> AM111 (Kolek <i>et al.</i> , 2008)

Tabla 5. Modificación y/o decoración microbiana de esteroides mediante aproximaciones tradicionales. Se muestran varios ejemplos de microorganismos aislados y/o seleccionados por su capacidad de modificar estero- y regio-específicamente moléculas esteroideas de interés farmacológico. Sólo se indica el producto mayoritario obtenido al final de la fermentación y no la presencia de otros intermediarios o subproductos. Abreviaturas: AD (4-androsten-3,17-diona), 9OH-AD (9 α -hidroxi-4-androsten-3,17-diona), DHEA (deshidroepiandrosterona), PREG (pregnenolona), PROG (progesterona), TS (testosterona).

B. Aproximaciones con tecnologías del ADN recombinante

Las aproximaciones con las tecnologías tradicionales arriba mencionadas son en ocasiones poco selectivas (aparición de subproductos) y requieren del cultivo de microorganismos patógenos oportunistas (p. ej., *R. oryzae*). Por ello, como alternativa se han diseñado distintas biofactorías celulares utilizando la tecnología del ADN recombinante. En la mayoría de los casos se ha optado por utilizar microorganismos modelo como por ejemplo *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* o *Saccharomyces cerevisiae* y se ha llevado a cabo la expresión heteróloga de uno o varios genes que codifican las proteínas involucradas en una única etapa enzimática que cataliza la biotransformación de un sustrato de interés. En la Tabla 6 se recogen algunos de los ejemplos más relevantes. Muchos de ellos se centran en la 9 α -hidroxilación o Δ 1,2-deshidrogenación de 3-cetoesteroides (Andor *et al.*, 2006; Arnell *et al.*, 2007; Li *et al.*, 2007; Petrusma *et al.*, 2009; Zhang *et al.*, 2013b; Zhang *et al.*, 2016; Shao *et al.*, 2017), que serán objeto de estudio de esta Tesis Doctoral. También se muestran ejemplos de clonación de genes de citocromos y de otras enzimas en especies de levaduras y bacterias no convencionales (p. ej., *P. putida*, *Corynebacterium glutamicum* (Tabla 6).

Hasta el momento, ninguna de estas aproximaciones se ha implementado a nivel industrial, probablemente a causa de las bajas conversiones de sustrato conseguidas que podrían estar asociadas con un transporte poco eficiente de esteroides en determinados microorganismos. Por este motivo, se continúa trabajando en la mejora genética racional de microorganismos capaces de naturalmente modificar esteroides. Por ejemplo, Zhang *et al.* (2013a) incrementaron la actividad 3-cetoesteroide- Δ 1-deshidrogenasa de una cepa de *A. simplex* mediante la integración genómica de múltiples copias del gen *ksdd* endógeno bajo el control de un promotor constitutivo. Del mismo modo, Kiss *et al.* (2015) incrementaron la actividad 15 β -hidroxilasa sobreexpresando el citocromo endógeno CYP106A2 en *Bacillus megaterium*.

Sustrato	Producto	Microorganismo	Manipulación génica
AD	ADD	<i>B. subtilis</i> WB600	Sobreexpresión del gen <i>ksdd</i> de <i>A. simplex</i> AS1.94 (Li <i>et al.</i> , 2007)
AD	ADD	<i>B. subtilis</i> 168	Sobreexpresión del gen <i>ksdd</i> de <i>M. neoaurum</i> JC-12 (Zhang <i>et al.</i> , 2013b)
AD	ADD	<i>B. subtilis</i> 168	Hiperproducción de la proteína Ksdd de <i>M. neoaurum</i> JC-12 (secuencia génica con el uso de codón optimizado). Sobreexpresión del gen <i>katA</i> de <i>Bacillus pumilus</i> ML 413 que codifica una catalasa para la reducción de los niveles endógenos de H ₂ O ₂ (Shao <i>et al.</i> , 2017)
Cortisona acetato	Prednisona acetato	<i>A. simplex</i> 156	Sobreexpresión del gen <i>ksdd</i> endógeno a través de la integración genómica de múltiples copias bajo el control de un promotor constitutivo (Zhang <i>et al.</i> , 2013a)
AD	9OH-AD	<i>E. coli</i> BL21	Sobreexpresión del gen <i>kshA1</i> de <i>M. smegmatis</i> mc ² 155 (Andor <i>et al.</i> , 2006)
AD	9OH-AD	<i>E. coli</i> BL21	Sobreexpresión de los genes <i>kshA</i> y <i>kshB</i> de <i>R. rhodochrous</i> DSM 43269 (Petrusma <i>et al.</i> , 2009)
AD	9OH-AD	<i>B. subtilis</i> 168	Sobreexpresión del gen <i>kshA</i> de <i>M. neoaurum</i> JC-12 y del gen <i>gdh</i> endógeno que codifica una glucosa 1-deshidrogenasa para regenerar el cofactor NADH (Zhang <i>et al.</i> , 2016)
PROG	9αOH-PROG	<i>E. coli</i> BL21	Sobreexpresión del gen <i>kshA1</i> de <i>M. smegmatis</i> mc ² 155 (Arnell <i>et al.</i> , 2007)
DHEA	7α-OH-DHEA	<i>S. cerevisiae</i>	Sobreexpresión del gen que codifica el citocromo CYP7B (Vico <i>et al.</i> , 2002)
PROG	11αOH-PROG	<i>Schizosaccharomyces pombe</i> 1445	Hiperproducción de la 11α-hidroxilasa de <i>R. oryzae</i> (coexpresión de los genes del citocromo CYP509C12 y de su componente NAD(P)H reductasa) (Petrič <i>et al.</i> , 2010)
(1) AD; (2) ADD	(1) 11αOH-AD; (2) 11αOH-ADD	<i>C. glutamicum</i> R31	Sobreexpresión de un operón sintético que codifica la enzima 11α-hidroxilasa de <i>R. oryzae</i> (Felpeto-Santero, 2016)
11-Deoxicortisol	Hidrocortisona	<i>S. pombe</i>	Hiperproducción de la 11β-hidroxilasa humana (coexpresión de los genes del citocromo CYP11B1 y de sus componentes adrenodoxina y adrenodoxina reductasa) (Hakki <i>et al.</i> , 2008)
(1) AD; (2) ADD	(1) 11βOH-AD; (2) 11βOH-ADD	<i>C. glutamicum</i> R31	Sobreexpresión de un operón sintético que codifica la enzima 11β-hidroxilasa de <i>C. lunatus</i> (Felpeto-Santero, 2016)

Sustrato	Producto	Microorganismo	Manipulación génica
DOC	15 β OH-DOC	<i>E. coli</i>	Hiperproducción del sistema 15 β -hidroxilasa de <i>B. megaterium</i> (coexpresión de los genes del citocromo y de sus componentes adrenodoxina y adrenodoxina reductasa) (Hannemann <i>et al.</i> , 2006)
TS	15 β OH-TS	<i>P. putida</i> S12	Sobreexpresión del gen que codifica el citocromo CYP106A2 de <i>B. megaterium</i> (Ruijsenaars <i>et al.</i> , 2007)
Ciproterona acetato	15 β OH-Ciproterona acetato	<i>B. megaterium</i> ATCC 13368	Sobreexpresión del gen del citocromo endógeno CYP106A2 (15 β -hidroxilación) (Kiss <i>et al.</i> , 2015)
PROG	17 α -OH-PROG (con 16-OH-prog.)	<i>Pichia pastoris</i> GS115	Sobreexpresión de un gen que codifica el citocromo P45017 humano (17 α -hidroxilación) (Kolar <i>et al.</i> , 2007)
(1) DHEA; (2) PREG	(1) AD ; (2) PROG	<i>C. glutamicum</i> R31	Sobreexpresión del gen de la 3 β -HSD de <i>M. smegmatis</i> mc ² 155 (MSMEG_5228) (García-Fernández, 2015)

Tabla 6. Modificación y/o decoración microbiana de esteroides mediante aproximaciones con tecnologías de ADN recombinante. Se muestran varios ejemplos de microorganismos recombinantes diseñados para modificar estero- y regio-específicamente moléculas esteroideas de interés farmacológico. Sólo se indica el producto mayoritario obtenido al final de la fermentación y no la presencia de otros intermediarios o subproductos. Abreviaturas: ADD (1,4-androstadien-3,17-diona), AD (4-androsten-3,17-diona), 9OH-AD (9 α -hidroxi-4-androsten-3,17-diona), DHEA (deshidroepiandrosterona), DOC (11-desoxicorticosterona o 21-hidroxiprogesterona), PREG (pregnenolona), PROG (progesterona), TS (testosterona).

2.2.3. Biosíntesis *de novo* de esteroides

En los últimos años se han descrito numerosos bioprocesos en los que se aplican aproximaciones de Ingeniería Metabólica y/o de Biología de Sistemas en la producción de compuestos de alto valor añadido (Nielsen and Keasling, 2016; Lee *et al.*, 2016; Silber *et al.*, 2016). Sin embargo, apenas se ha explorado esta posibilidad en la Biotecnología de Esteroides y sólo existen dos ejemplos que ponen de relieve el potencial de estas disciplinas. La biosíntesis *de novo* de progesterona e hidrocortisona a partir de fuentes de carbono sencillas (p. ej., galactosa, etanol) fue exitosamente lograda en cepas recombinantes de *S. cerevisiae* (Duport *et al.*, 1998; Szczebara *et al.*, 2003). Para ello, se modificó la biosíntesis endógena de esteroides de la levadura para la generación de un derivado estructuralmente similar al colesterol, que sirvió de precursor de una ruta heteróloga multi-enzimática que simulaba la síntesis humana de progesterona o hidrocortisona.

2.2.4. Otras aplicaciones biotecnológicas y/o biomédicas del metabolismo microbiano de esteroides

A continuación se enumeran otras aplicaciones biotecnológicas y/o biomédicas derivadas del estudio de las rutas de degradación y/o modificación microbiana de distintos esteroides:

- Identificación y/o utilización de microorganismos degradadores de esteroides como agentes

biológicos descontaminantes del medio ambiente.

Los microorganismos degradadores de esteroides pueden ser utilizados para eliminar (degradar) diversos tipos de moléculas esteroideas presentes en el medio ambiente que son consideradas contaminantes ambientales. Por ejemplo, en los últimos años se han realizado esfuerzos notables por identificar microorganismos o consorcios microbianos capaces de degradar/transformar eficientemente los estrógenos naturales o sintéticos que se acumulan en las aguas residuales urbanas y que presentan potentes actividades biológicas como disruptores endocrinos (ver Apartado 1.1.2. de la Introducción).

- **Identificación de nuevas dianas farmacológicas para el tratamiento de enfermedades causadas por actinobacterias patógenas.**

El catabolismo del colesterol es esencial para la supervivencia y patogénesis de ciertas actinobacterias como por ejemplo *M. tuberculosis*, *M. leprae*, *M. bovis* o *R. equi* (van der Geize *et al.*, 2007, 2011; Pandey y Sassetti, 2008). Por tanto, el desarrollo de fármacos que actúen/inhiban las etapas enzimáticas del catabolismo de esteroides que son esenciales para estos patógenos puede resultar de interés para el tratamiento de estas enfermedades.

- **Desarrollo de biosensores para la cuantificación de colesterol.**

Los biosensores de colesterol son instrumentos con una o varias enzimas (p. ej., colesterol oxidasas o colesterol esterasas) que actúan como sensores biológicos al modificar el colesterol presente en las muestras. Son utilizados de manera rutinaria en análisis clínicos y controles de calidad en la industria alimentaria (García *et al.*, 2012).

- **Administración oral de probióticos para la reducción de los niveles de colesterol en sangre.**

Muchos estudios *in vitro* e *in vivo* han demostrado que la ingesta de bacterias probióticas de los géneros *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Enterococcus*, *Streptococcus* o *Bifidobacterium*, tiene múltiples efectos beneficiosos en la salud humana como por ejemplo la reducción de los niveles de colesterol en sangre (Pereira y Gibson, 2002). En este sentido, se han sugerido varios mecanismos de acción que no siempre implican la transformación directa del colesterol por la acción de las cepas probióticas. Entre estos mecanismos se incluyen la incorporación del colesterol en las membranas celulares de las bacterias probióticas, la desconjugación enzimática de las sales biliares, la co-precipitación del colesterol con ácidos biliares o la conversión de colesterol a coprostanol (García *et al.*, 2012). El estudio detallado de estos mecanismos de acción puede contribuir al desarrollo de nuevos tratamientos médicos para la aterosclerosis como a continuación se detalla.

- **Biorremediación médica para el tratamiento de la aterosclerosis: administración terapéutica de xenoenzimas degradadoras de colesterol.**

La biorremediación médica se basa en la administración terapéutica de enzimas para combatir el envejecimiento y/o tratar enfermedades que se desarrollan como consecuencia del depósito anómalo de determinados compuestos en los tejidos (p. ej., la acumulación de colesterol y ciertos derivados en las arterias de los enfermos de aterosclerosis). El proceso de biorremediación para el tratamiento de la aterosclerosis implicaría las siguientes etapas: (i) identificación de enzimas (p.ej., colesterol reductasas) capaces de degradar o modificar el colesterol y sus derivados cuya acumulación provoca la aparición de la enfermedad; (ii) producción heteróloga y purificación de las enzimas, (iii) administración de las enzimas al paciente (Schloendorn *et al.*, 2009; Ooi y Liong, 2010).

IV. OBJETIVOS

La presente Tesis Doctoral con título “Biotransformación bacteriana de esteroides” se incluye en el área de la Biotecnología Microbiana. Al inicio de la misma, se propusieron dos objetivos fundamentales utilizando como bacteria modelo para el estudio *Mycobacterium smegmatis* mc²155:

1. Estudio de las rutas catabólicas de esteroides en *M. smegmatis*

En numerosos estudios se ha demostrado la existencia de redundancias en las enzimas clave del catabolismo de esteroides en diferentes especies de actinobacterias (p. ej., KstD, KSH). La existencia de múltiples *clusters* génicos involucrados en la degradación de estos compuestos en algunas de estas bacterias, les confiere la capacidad de mineralizar un amplio rango de esteroides (p. ej., esteroides, ácidos biliares, testosterona, progesterona). Resulta curioso que la mayoría de estos estudios hayan sido llevados a cabo en especies de los géneros *Rhodococcus* o *Gordonia* y, no exista apenas información disponible relativa a especies del género *Mycobacterium*. Por ello, como primer objetivo de esta Tesis Doctoral se estudiará la mineralización de algunos esteroides androgénicos (p. ej., androst-4-en-3,17-diona) utilizando como modelo la bacteria *M. smegmatis*, que ha sido extensivamente utilizada en las últimas décadas para el estudio del catabolismo del colesterol en actinobacterias. Los objetivos parciales perseguidos con este objetivo son:

- 1.1. Análisis de la diversidad y distribución de los clusters génicos de catabolismo de esteroides en actinobacterias.**
- 1.2. Identificación de dianas génicas para el diseño de biofactorías celulares para la producción biotecnológica de esteroides.**
- 1.3. Identificación de nuevas actividades enzimáticas modificadoras de esteroides.**

2. Desarrollo de *M. smegmatis* como una biofactoría ideal para la producción de esteroides a la carta

La utilización de biocatalizadores microbianos en los procesos de biotransformación de esteroides presenta ventajas respecto al uso de catalizadores químicos. Por ello, tradicionalmente se han utilizado microorganismos aislados del medio ambiente que presentan actividades enzimáticas modificadoras de esteroides de interés. Sin embargo, dado que algunos de estos procesos, especialmente si se realizan con el organismo completo, pueden ser poco selectivos con la aparición de subproductos no deseados, en los últimos años se ha explorado la aplicación de aproximaciones de Ingeniería Metabólica y Biología Sintética en el desarrollo de biofactorías celulares a la carta. En esta Tesis Doctoral, se propone la utilización de *M. smegmatis* mc²155 como biofactoría celular para la producción de esteroides y para ello se estudiarán tres ejemplos prácticos de relevancia industrial que servirán como pruebas de concepto y que constituyen los objetivos parciales de este trabajo:

- 2.1. Producción de 9 α -hidroxi-4-androsten-3,17-diona a partir de esteroides.**
- 2.2. Producción de testosterona.**
- 2.3. Otras modificaciones esteroideas de relevancia industrial: Δ 1,2-deshidrogenación y 9 α -hidroxilación de 3-cetoesteroides.**

V. MATERIALES Y MÉTODOS

1. Cepas bacterianas, plásmidos y oligonucleótidos

Las cepas bacterianas utilizadas en este trabajo se detallan en la Tabla 7, junto con sus genotipos y referencias. Los plásmidos empleados para la clonación, mutación y expresión génica son mostrados en la Tabla 8. Todos los oligonucleótidos empleados en este trabajo aparecen detallados en la Tabla 9 y fueron adquiridos en Sigma-Aldrich.

Tabla 7. Cepas bacterianas empleadas en este trabajo.

Cepas	Genotipo/Fenotipo	Referencia
<i>Escherichia coli</i>		
DH10B	F', <i>mcrA</i> , $\Delta(mrr, hsdRMS-mcrBC)$, $\Phi80lacZ\Delta M15$, $\Delta lacX74$, <i>deoR</i> , <i>recA1</i> , <i>araD139</i> , $\Delta(ara-leu)7697$, <i>galU</i> , <i>galK</i> , λ , <i>rpsL</i> , <i>endA1</i> , <i>nupG</i>	Invitrogen
<i>Mycobacterium smegmatis</i>		
mc ² 155	ept ⁻¹ , mutante de mc ² 6 eficiente para electroporación	Snapper <i>et al.</i> , 1990
DSM 43465	Cepa de referencia de <i>M. smegmatis</i>	Colección DSMZ Trevisan, 1889; Lehmann y Neumann, 1899
$\Delta kstR$	mc ² 155 con el gen <i>MSMEG_6042</i> deletado ($\Delta kstR$)	Kendall <i>et al.</i> , 2007
$\Delta kstR2$	mc ² 155 con el gen <i>MSMEG_6009</i> deletado ($\Delta kstR2$)	Kendall <i>et al.</i> , 2010
MS6039	mc ² 155 con el gen <i>MSMEG_6039</i> deletado ($\Delta kshB1$)	Galán <i>et al.</i> , 2017
MS6039-5941	mc ² 155 con los genes <i>MSMEG_6039</i> y <i>MSMEG_5941</i> deletados ($\Delta kshB1 \Delta kstD1$)	Galán <i>et al.</i> , 2017
MS5941	mc ² 155 con el gen <i>MSMEG_5941</i> deletado ($\Delta kstD1$)	Este trabajo
ADD+	Mutante mc ² 155 con fenotipo C-19+ obtenido en medio mínimo con ADD	Este trabajo
M1	Mutante mc ² 155 con fenotipo C-19+ obtenido en medio mínimo con ADD	Este trabajo
M2	Mutante DSM 43465 con fenotipo C-19+ obtenido en medio mínimo con AD	Este trabajo
M3	Mutante MS6039-5941 con fenotipo C-19+ obtenido en medio mínimo con AD	Este trabajo
M4	Mutante mc ² 155 con fenotipo C-19+ obtenido en medio mínimo con 9OH-AD	Este trabajo
M5	Mutante DSM 43465 con fenotipo C-19+ obtenido en medio mínimo con 9OH-AD	Este trabajo
MS6039-5941 AD+I	Mutante MS6039-5941 con fenotipo C-19+ obtenido en medio mínimo con AD	Este trabajo
MS6039-5941 AD+II	Mutante MS6039-5941 con fenotipo C-19+ obtenido en medio mínimo con AD	Este trabajo
MS6039-5941 AD+III	Mutante MS6039-5941 con fenotipo C-19+ obtenido en medio mínimo con AD	Este trabajo

Cepas	Genotipo/Fenotipo	Referencia
MS6039-5941 AD+IV	Mutante MS6039-5941 con fenotipo C-19+ obtenido en medio mínimo con AD	Este trabajo
MS2868	mc ² 155 con el gen <i>MSMEG_2868</i> delecionado ($\Delta padR$)	Este trabajo
MS2891	mc ² 155 con el gen <i>MSMEG_2891</i> delecionado ($\Delta hsaC2$)	Este trabajo
MS2892	mc ² 155 con el gen <i>MSMEG_2892</i> delecionado ($\Delta hsaA2$)	Este trabajo
MS2900	mc ² 155 con el gen <i>MSMEG_2900</i> delecionado ($\Delta hsaD2$)	Este trabajo
Otras especies micobacterianas		
<i>M. neoaurum</i> DSM 44074	Micobacteria de crecimiento rápido	Colección DSMZ Tsukamura <i>et al.</i> , 1972
DSM 44074+1	Mutante DSM 44074 con fenotipo C-19+ obtenido en medio mínimo con ADD	Este trabajo
DSM 44074+2	Mutante DSM 44074 con fenotipo C-19+ obtenido en medio mínimo con 9OH-AD	Este trabajo
<i>Mycobacterium</i> sp. NRRL B-3805	Mutante de <i>M. neoaurum</i> obtenido en un programa de mutagénesis clásico; productora de AD a partir de esteroides	Colección ARS (NRRL) Marshech <i>et al.</i> , 1972
Otras especies bacterianas		
<i>Comamonas testosteroni</i> ATCC® 11996™	Bacteria degradadora de testosterona	Colección ATCC

Tabla 8. Plásmidos y construcciones empleadas en este trabajo.

Plásmido	Descripción	Referencia
Plásmidos utilizados para la elaboración de mutantes de deleción génica		
pJQ200x	Vector de clonación no replicativo en micobacterias utilizado para la construcción de mutantes por recombinación homóloga, P15A <i>ori</i> , <i>sacB</i> , <i>xyIE</i> , Gm ^R	Jackson <i>et al.</i> , 2001
pJQ5941	pJQ200x que contiene los fragmentos UP-5941 y DOWN-5941 empleado para la construcción del mutante MS5941, Gm ^R	Galán <i>et al.</i> , 2017
pJQ2868	pJQ200x que contiene los fragmentos UP-2868 y DOWN-2868 empleado para la construcción del mutante MS2868, Gm ^R	Este trabajo
pJQ2891	pJQ200x que contiene los fragmentos UP-2891 y DOWN-2891 empleado para la construcción del mutante MS2891, Gm ^R	Este trabajo
pJQ2892	pJQ200x que contiene los fragmentos UP-2892 y DOWN-2892 empleado para la construcción del mutante MS2892, Gm ^R	Este trabajo
pJQ2900	pJQ200x que contiene los fragmentos UP-2900 y DOWN-2900 empleado para la construcción del mutante MS2900, Gm ^R	Este trabajo
Plásmidos utilizados para la expresión génica heteróloga		
pGEM®-T Easy	Vector de clonación <i>ori ColE1</i> , Ap ^R , <i>lacZα</i>	Promega
pGEMT-6039	pGEM®-T Easy que contiene el gen <i>MSMEG_6039</i> (<i>kshB1</i>), Ap ^R	Este trabajo

Plásmido	Descripción	Referencia
pGEMT-KstD1	pGEM®-T Easy que contiene el gen <i>kstD1</i> de <i>R. ruber</i> Chol-4, Ap ^R	Este trabajo
pGEMT-KstD2	pGEM®-T Easy que contiene el gen <i>kstD2</i> de <i>R. ruber</i> Chol-4, Ap ^R	Este trabajo
pGEMT-HSDCT	pGEM®-T Easy que contiene el gen de la 17β-HSD de <i>C. testosteroni</i> , Ap ^R	Este trabajo
pETKstD1	pET-3b que contiene el gen <i>KstD1</i> de <i>R. ruber</i> Chol-4 clonado entre las dianas de restricción <i>NdeI</i> - <i>BglII</i> , Ap ^R	Fernández de las Heras, 2013
pETKstD2	pET-3b que contiene el gen <i>KstD2</i> de <i>R. ruber</i> Chol-4 clonado entre las dianas de restricción <i>NdeI</i> - <i>BglII</i> , Ap ^R	Fernández de las Heras, 2013
pMV261	Vector de expresión en micobacterias bajo el control del promotor <i>P_{hsp60}</i> , Km ^R	Stover <i>et al.</i> , 1991
pMV2867	pMV261 que contiene el gen <i>MSMEG_2867</i> (<i>kstD3</i>) clonado entre las dianas de restricción <i>EcoRI</i> - <i>HindIII</i> , Km ^R	Este trabajo
pMVPadR	pMV261 que contiene el gen <i>MSMEG_2868</i> (<i>padR</i>) clonado entre las dianas de restricción <i>BamHI</i> - <i>EcoRI</i> , Km ^R	Este trabajo
pMV2869	pMV261 que contiene el gen <i>MSMEG_2869</i> (<i>kstD2</i>) clonado entre las dianas de restricción <i>EcoRI</i> - <i>HindIII</i> , Km ^R	Este trabajo
pMV2870	pMV261 que contiene el gen <i>MSMEG_2870</i> (<i>kshA2</i>) clonado entre las dianas de restricción <i>EcoRI</i> - <i>HindIII</i> , Km ^R	Este trabajo
pMV2891	pMV261 que contiene el gen <i>MSMEG_2891</i> (<i>hsaC2</i>) clonado entre las dianas de restricción <i>EcoRI</i> - <i>HindIII</i> , Km ^R	Este trabajo
pMV2892	pMV261 que contiene el gen <i>MSMEG_2892</i> (<i>hsaA2</i>) clonado entre las dianas de restricción <i>EcoRI</i> - <i>HindIII</i> , Km ^R	Este trabajo
pMV2893	pMV261 que contiene el gen <i>MSMEG_2893</i> (<i>kshB2</i>) clonado entre las dianas de restricción <i>BamHI</i> - <i>EcoRI</i> , Km ^R	Este trabajo
pMV2900	pMV261 que contiene el gen <i>MSMEG_2900</i> (<i>hsaD2</i>) clonado entre las dianas de restricción <i>EcoRI</i> - <i>HindIII</i> , Km ^R	Este trabajo
pMV5925	pMV261 que contiene el gen <i>MSMEG_5925</i> (<i>kshA1</i>) clonado entre las dianas de restricción <i>EcoRI</i> - <i>HindIII</i> , Km ^R	Este trabajo
pMV5941	pMV261 que contiene el gen <i>MSMEG_5941</i> (<i>kstD1</i>) clonado entre las dianas de restricción <i>EcoRI</i> - <i>HindIII</i> , Km ^R	Este trabajo
pMV6039	pMV261 que contiene el gen <i>MSMEG_6039</i> (<i>kshB1</i>) clonado entre las dianas de restricción <i>EcoRI</i> - <i>HindIII</i> , Km ^R	Este trabajo
pMVKstD1r	pMV261 que contiene el gen <i>KstD1</i> de <i>R. ruber</i> Chol-4 clonado en la diana de restricción <i>EcoRI</i> , Km ^R	Este trabajo
pMVKstD2r	pMV261 que contiene el gen <i>KstD2</i> de <i>R. ruber</i> Chol-4 clonado en la diana de restricción <i>EcoRI</i> , Km ^R	Este trabajo
pUC57-17HSD	pUC57 que contiene el gen sintético de la 17β-HSD de <i>C. lunata</i> (suministrado por la empresa que sintetizó el gen)	Este trabajo
pHSDCT	pMV261 que contiene el gen de la 17β-HSD de <i>C. testosteroni</i> clonado entre las dianas de restricción <i>EcoRI</i> - <i>HindIII</i> , Km ^R	Este trabajo
pHSDCL	pMV261 que contiene el gen sintético de la 17β-HSD de <i>C. lunata</i> clonado entre las dianas de restricción <i>EcoRI</i> - <i>HindIII</i> , Km ^R	Este trabajo

Tabla 9. Oligonucleótidos empleados en este trabajo. Las secuencias en negrita se corresponden con dianas de restricción incluidas en los oligonucleótidos para facilitar tareas de subclonaje.

Oligonucleótido	Secuencia 5' - 3'	Utilización
Oligonucleótidos utilizados para la clonación de genes		
MSMEG_2867F	CGC GGATCCT GAGGTAAGGAGGTGAATATGC	Amplificación del gen <i>MSMEG_2867</i> para su clonación en pMV261 (<i>EcoRI-HindIII</i>)
MSMEG_2867R	CCGACCAAAGATCTGAG	
MSMEG_2867R	CCG GAA TTCTCACGCCGTGGTGCCTTC	Amplificación del gen <i>MSMEG_2868</i> para su clonación en pMV261 (<i>BamHI-EcoRI</i>)
PadRF	CG GGATCCT AGCCTAAGGAGATGAACATATG	
PadRR	ACAGATGCCGCCGACAC	Amplificación del gen <i>MSMEG_2869</i> para su clonación en pMV261 (<i>EcoRI-HindIII</i>)
MSMEG_2869F	CG GAA TTCTGACCTAAGGAGCTGATATGACT	
MSMEG_2869R	GATCCCCAGAACCTCACC	Amplificación del gen <i>MSMEG_2870</i> para su clonación en pMV261 (<i>EcoRI-HindIII</i>)
MSMEG_2870F	CCG AAGCTT TCAGTCGAGCCGGCCTG	
MSMEG_2870R	CCG AAGCTT TCAGCTGACCTAAGGAGGTGAATATGAC	Amplificación del gen <i>MSMEG_2871</i> para su clonación en pMV261 (<i>EcoRI-HindIII</i>)
MSMEG_2891F	ATCGTTGCAGCCCGAC	
MSMEG_2891R	CCG AAGCTT TCAGTCCGCTGCATCGCCCGC	Amplificación del gen <i>MSMEG_2892</i> para su clonación en pMV261 (<i>EcoRI-HindIII</i>)
MSMEG_2892F	CG GAA TTCTGACCTAAGGAGGTGAATCATAT	
MSMEG_2892R	GACAAAACGGGTGATCGACGG	Amplificación del gen <i>MSMEG_2893</i> para su clonación en pMV261 (<i>BamHI-EcoRI</i>)
MSMEG_2893F	CCG AAGCTT TCAGATCATCGCCCGCAGC	
MSMEG_2893R	CGC GGATCCT AGCCTAAGGAGATGAACATAT	Amplificación del gen <i>MSMEG_2900</i> para su clonación en pMV261 (<i>EcoRI-HindIII</i>)
MSMEG_2900F	GTCCGACGTGCAATCCAGC	
MSMEG_2900R	CG GAA TTCTCAGAACTCGATCCTTATCCGGT	Amplificación del gen <i>MSMEG_5925</i> para su clonación en pMV261 (<i>EcoRI-HindIII</i>)
MSMEG_5925F	CT GAA TTCTAGCCTAAGGAGGTGAATATGGCT	
MSMEG_5925R	ACCGAGACTGTCGG	Amplificación del gen <i>MSMEG_5941</i> para su clonación en pMV261 (<i>EcoRI-HindIII</i>)
MSMEG_5941F	CCG AAGCTT TCAGCTCGACTGCTCCGC	
MSMEG_5941R	CG GAA TTCTGACCTAAGGAGGTGAATATGAC	Amplificación del gen <i>MSMEG_6039</i> para su clonación en pMV261 (<i>EcoRI-HindIII</i>)
MSMEG_6039F	TGGACAGGAGTACGAC	
MSMEG_6039R	CG AAGCTT CTATTCTGTCGTAGGTGACTTCG	Amplificación del gen <i>kstD1</i> de <i>R. ruber</i> str. Chol-4 para su clonación en pGEM®-T Easy
KstD1_Chol4_F	GCTCTAGATGAGGTAAGGAGGTGAATATGGT	
KstD1_Chol4_R	GGATTGGGCAGAGG	Amplificación del gen <i>kstD2</i> de <i>R. ruber</i> str. Chol-4 para su clonación en pGEM®-T Easy
KstD2_Chol4_F	CG GAA TTCTACGCGCCGGCCATGTG	
KstD2_Chol4_R	GCTCTAGATGAGGTAAGGAGGTGAATATGGC	
	GACCAATCCCGTAC	
	CG GAA TTCTCAGCGGGACTTCGCGG	

Oligonucleótido	Secuencia 5' - 3'	Utilización
HDHF	AGAGGAGATATACCATGGGCAGCAGCCATCA TCATCATCATCACACAAATCGTTTGAGGGTA AGG	Amplificación del gen de la 17-HSD de <i>C. testosteroni</i> para su clonación en Easy
HDHR	AAGCTT CTATAGCCCCATGCCCAAGATCG	
Oligonucleótidos utilizados para analizar la expresión génica		
MSMEG_2758qF	GTGACCGACGATCTCGAGGCTG	Amplificación de un fragmento interno del gen <i>MSMEG_2758 (sigA)</i>
MSMEG_2758qR	CTTGCCGATCTGCTTGAGGTAGG	
MSMEG_2867qF	GGTCTTTCCGGTGCTGCTGG	Amplificación de un fragmento interno del gen <i>MSMEG_2867 (kstD3)</i>
MSMEG_2867qR	CGAGGGTGTCGTCGGTTC	
MSMEG_2868qF	GGTGACGAAGTGTCCGGTTAC	Amplificación de un fragmento interno del gen <i>MSMEG_2868 (padR)</i>
MSMEG_2868qR	CGCTCCAGTCGCTTCAGTTC	
MSMEG_2869qF	CGAAGCCACCGACTACATG	Amplificación de un fragmento interno del gen <i>MSMEG_2869 (kstD2)</i>
MSMEG_2869qR	GGTGGCAAGCAGATAGCTG	
MSMEG_2870qF	GCCACGCAGTACTACAAGAG	Amplificación de un fragmento interno del gen <i>MSMEG_2870 (kshA2)</i>
MSMEG_2870qR	CAGGTCGTCGATCATGAAGG	
MSMEG_2890qF	CATGCTTGAGCGACTGGTCC	Amplificación de un fragmento interno del gen <i>MSMEG_2890 (iclR)</i>
MSMEG_2890qR	CTTGTCAGCCGGTCTCTG	
MSMEG_2891qF	CAAGATCGTCACCGTCGGCTG	Amplificación de un fragmento interno del gen <i>MSMEG_2891 (hsaC2)</i>
MSMEG_2891qR	ACTGTCGGCTTCGGCGAGC	
MSMEG_2892qF	GAGTTCGCCGAGACCGTCATG	Amplificación de un fragmento interno del gen <i>MSMEG_2892 (hsaA2)</i>
MSMEG_2892qR	CCCAGATCTCTTCTCCACCC	
MSMEG_2893qF	GGTTGACGGTGTGCACTG	Amplificación de un fragmento interno del gen <i>MSMEG_2893 (kshB2)</i>
MSMEG_2893qR	CGCAGATGAACGACTCGTAAC	
MSMEG_2894qF	CCTGCACAAGTTCCGTGGC	Amplificación de un fragmento interno del gen <i>MSMEG_2894 (smo)</i>
MSMEG_2894qR	GGAGAACGAGTAGCTGTAGTCG	
MSMEG_2900qF	CGACTTCGGTGGTCATCCCATG	Amplificación de un fragmento interno del gen <i>MSMEG_2900 (hsaD2)</i>
MSMEG_2900qR	GGTTGATGGCGAAGTTGATCCC	
MSMEG_5925qF	GACCGGTGAAGAACTTCTCGG	Amplificación de un fragmento interno del gen <i>MSMEG_5925 (kshA1)</i>
MSMEG_5925qR	GCACGAGCTTGCACTTGCC	
MSMEG_5940qF	GCCTACGAGATCCAGCTGATC	Amplificación de un fragmento interno del gen <i>MSMEG_5940 (hsaE)</i>
MSMEG_5940qR	CCCATCATCTCCTGCATCGC	
MSMEG_5941qF	CGAACAACGAGATCCTCAAGCG	Amplificación de un fragmento interno del gen <i>MSMEG_5941 (kstD1)</i>
MSMEG_5941qR	CGAACGGCTTCGGCTCGAC	
MSMEG_6000qF	TGCCGTACGAGTTCCACAGC	Amplificación de un fragmento interno del gen <i>MSMEG_6000</i> (regulón <i>kstR2</i>)
MSMEG_6000qR	CCTGGTTCTGCATGACCGC	
MSMEG_6012qF	GCTCGCAGACAATCTCGTCGG	Amplificación de un fragmento interno del gen <i>MSMEG_6012</i> (regulón <i>kstR2</i>)
MSMEG_6012qR	GTGGTTGACCTGTCCGGCG	
MSMEG_6038qF	CTGCTGCCGAAGCTGCGTG	Amplificación de un fragmento interno del gen <i>MSMEG_6038 (hsaA1)</i>
MSMEG_6038qR	GATCGAACAGCGCAGGTGC	
MSMEG_6039qF	CGGCCAGTTCCTGACGCTG	Amplificación de un fragmento interno del gen <i>MSMEG_6039 (kshB1)</i>
MSMEG_6039qR	CGGATTGTCAGATCGCCATCATC	

Oligonucleótido	Secuencia 5' - 3'	Utilización
Oligonucleótidos utilizados para la elaboración de mutantes de delección génica		
PadR_UP_F	CTAGTCTAGAGAACCGTCCGACCAGTGCG	Amplificación del fragmento UP-PadR para la construcción del mutante de delección del gen <i>MSMEG_2868</i> (<i>XbaI</i> - <i>EcoRI</i>)
PadR_UP_R	CGGAATTCGACACGTTTCAGCTCACCAGAG	
PadR_DOWN_F	CGGAATTCCAGCTCGCCGAGACAGGCG	Amplificación del fragmento DOWN-PadR para la construcción del mutante de delección del gen <i>MSMEG_2868</i> (<i>EcoRI</i> - <i>SacI</i>)
PadR_DOWN_R	GCCGAGCTCATGATCTTCGACCAGCGG	
MSMEG_2891_UP_F	CTAGTCTAGAGACGGCATGAAGGTCATGGAC	Amplificación del fragmento UP-2891 para la construcción del mutante de delección del gen <i>MSMEG_2891</i> (<i>XbaI</i> - <i>EcoRI</i>)
MSMEG_2891_UP_R	CGGAATTCATGCTCGTGGTCTCCTGCTC	
MSMEG_2891_DOWN_F	CGGAATTCAGCCGTGAGCACC GGCC	Amplificación del fragmento DOWN-2891 para la construcción del mutante de delección del gen <i>MSMEG_2891</i> (<i>EcoRI</i> - <i>SacI</i>)
MSMEG_2891_DOWN_R	GCCGAGCTCGCCAGCACATCGTCGGTGAG	
MSMEG_2892_UP_F	CTAGTCTAGACCGAACTGCGTGAAGTGGCC	Amplificación del fragmento UP-2892 para la construcción del mutante de delección del gen <i>MSMEG_2892</i> (<i>XbaI</i> - <i>EcoRI</i>)
MSMEG_2892_UP_R	CGGAATTCATGGAACCGATCGTGGACC	
MSMEG_2892_DOWN_F	CGGAATTCCTGCGGGCGATGATCTGAGC	Amplificación del fragmento DOWN-2892 para la construcción del mutante de delección del gen <i>MSMEG_2892</i> (<i>EcoRI</i> - <i>SacI</i>)
MSMEG_2892_DOWN_R	GCCGAGCTCTGGCGTTCGTTGACTCCG	
MSMEG_2900_UP_F	CTAGTCTAGAACAGGCGTAGACATCGACGC	Amplificación del fragmento UP-2900 para la construcción del mutante de delección del gen <i>MSMEG_2900</i> (<i>XbaI</i> - <i>EcoRI</i>)
MSMEG_2900_UP_R	CGGAATTCGTAGTCGATCGCCTGCATGC	
MSMEG_2900_DOWN_F	CGGAATTCCAACTAGTCAGCGGCGTCG	Amplificación del fragmento DOWN-2900 para la construcción del mutante de delección del gen <i>MSMEG_2900</i> (<i>EcoRI</i> - <i>SacI</i>)
MSMEG_2900_DOWN_R	GCCGAGCTCGAGCGTGACGATGCCGAAG	
MSMEG_5941_UP_F	CTAGACTAGTGATGTTGCGAATGTCGATGTC	Amplificación del fragmento UP-5941 para la construcción del mutante de delección del gen <i>MSMEG_5941</i> (<i>SpeI</i> - <i>XbaI</i>)
MSMEG_5941_UP_R	CTAGTCTAGACCACCACAACGTCGTACTCC	
MSMEG_5941_DOWN_F	CTAGTCTAGACCATGACATTTCGGTTACCTGG	Amplificación del fragmento DOWN-5941 para la construcción del mutante de delección del gen <i>MSMEG_5941</i> (<i>XbaI</i> - <i>SacI</i>)
MSMEG_5941_DOWN_R	CTAGGAGCTCGCAGGGAGATCTCGAAATCG	
Oligonucleótidos utilizados para otras aplicaciones		
GM3	AGAGTTTGATCMTGGC	Secuenciación de <i>ARNr 16S</i>
GM4	TACCTTGTTACGACTT	Muyzer <i>et al.</i> , 1995
MSMEG_2868seqF	CAGCACCGAAAGACCCTCC	Secuenciación de <i>padR</i> (<i>MSMEG_2868</i>)
MSMEG_2868seqR	CAACACCGCCGCCAACAC	

Oligonucleótido	Secuencia 5' - 3'	Utilización
MSMEG_2858qF	GGTCGTGTTGTACCAGAAGAATTTCCG	Secuenciación de <i>padR</i> (MSMEG_2868) en la cepa mutante M2
MSMEG_2870seqR	CCACACGAACAGCATGCCG	
MSMEG_2890seq1F	CACCGCCGAAGAGATCACC	Secuenciación de <i>iclR</i> (MSMEG_2890)
MSMEG_2890seq1R	CCGCCACATCGCCGAAG	
MSMEG_2890seq2F	GATCGCGGACATCATCGAGG	Secuenciación de <i>iclR</i> (MSMEG_2890)
MSMEG_2890seq2R	GAGCTGATGGCGATGGGGC	
MSMEG_2898seqF	CGTGGCCTCTACGTTCCAC	Secuenciación de <i>tetR</i> (MSMEG_2898)
MSMEG_2898seqR	GTTCTCCTCCAATAGATGTTAGACAAC	
PadRn_seqF	GTTCCAGCGACACCGACGTG	Secuenciación de <i>padR</i> (<i>M. neoaurum</i>)
PadRn_seqR	CCTGCGGCGGTGTGCAAG	

2. Medios y condiciones de cultivo

Todas las soluciones y medios de cultivo utilizados en este trabajo se esterilizaron por calor húmedo en un autoclave a 121 °C y 1 atm de presión o mediante filtración utilizando filtros estériles Millipore de 0,2 µm de diámetro (Merck). Los antibióticos (Sigma) se prepararon en soluciones acuosas a 1000 mg mL⁻¹, se esterilizaron por filtración y se conservaron a -20 °C.

2.1. Medios y condiciones de cultivo empleados para *Mycobacterium* sp.

El cultivo líquido de micobacterias se realizó en los medios LB o Middlebrook 7H9 Broth (Difco) suplementado con 0,4% de glicerol (Merck). Los cultivos en medio mínimo se realizaron en medio Middlebrook 7H9 (sin glicerol) suplementado con una o varias fuentes de carbono a la concentración deseada según el objetivo del estudio. En todos los cultivos líquidos se adicionó Tween 80 (Sigma) al 0,05-0,1% para evitar la agregación bacteriana, excepto en aquellos medios en los que se utilizó el detergente Tyloxapol (Sigma) como agente solubilizante de esteroides. Para el cultivo sólido se usaron placas de Bacto Middlebrook 7H10 Agar (Difco) suplementadas con 10% albúmina-dextrosa-catalasa (ADC) (Becton Dickinson) o LB con 1,5% de agar. En caso de ser necesario se añadieron antibióticos a las siguientes concentraciones: Km (20 µg mL⁻¹), Gm (5 µg mL⁻¹) (Sigma). Las cepas de *M. smegmatis* se cultivaron a 37 °C y las cepas del resto de especies de micobacterias se cultivaron a 30 °C. Los cultivos en medio líquido se llevaron a cabo en un agitador orbital a 200 rpm y el crecimiento bacteriano fue monitorizado por turbidimetría a 600 nm (D.O.₆₀₀) empleando un espectrofotómetro UVMMini-1240 (Shimadzu).

2.2. Medios y condiciones de cultivo utilizados para otras bacterias

Los cultivos en estado líquido de *E. coli* y *C. testosteroni* se llevaron a cabo en el medio rico Luria-Bertani (Lysogeny Broth, LB) (Sambrook y Russell, 2001). Los cultivos en medio sólido se realizaron con LB al que se adicionó Bacto Agar (Pronadisa) al 1,5% (p/v). Las células de *E. coli* fueron crecidas a 37 °C y cuando fue necesario, se añadieron antibióticos a las siguientes concentraciones finales: ampicilina (Ap) (100 µg mL⁻¹), kanamicina (Km) (50 µg mL⁻¹), gentamicina (Gm) (10 µg mL⁻¹) (Sigma). Las células de *C. testosteroni* fueron crecidas a 30 °C. Los cultivos líquidos se llevaron a cabo en un agitador orbital a 200

rpm y el crecimiento fue monitorizado mediante turbidimetría a 600 nm (D.O.₆₀₀) empleando un espectrofotómetro UVMini-1240 (Shimadzu).

2.3. Conservación de las cepas bacterianas

Las cepas bacterianas se conservaron a 4 °C en placas de medio sólido (LB o 7H10) durante periodos inferiores a un mes. Para la conservación a largo plazo, se cultivaron en el medio de cultivo correspondiente y se congelaron a -80 °C con glicerol 20% (v/v) (cepas de *E. coli* y *C. testosteroni*) o 50% (v/v) (cepas de *Mycobacterium* sp.).

3. Experimentos de transferencia génica

3.1. Transformación de células de *E. coli*

Las células de *E. coli* fueron modificadas genéticamente por transformación tras hacerlas competentes mediante el método de cloruro de rubidio (Wirth *et al.*, 1989) y choque térmico (Sambrook y Russell, 2001).

3.2. Transformación de células de *M. smegmatis*

3.2.1. Preparación de células electrocompetentes

Las células electrocompetentes de *M. smegmatis* se preparon siguiendo un protocolo descrito por Parish y Stoker (1998). En primer lugar, se sembró una colonia de la cepa de interés en 10 mL de medio 7H9-glicerol-ADC-Tween80 y se incubó a 37 °C hasta alcanzar la fase estacionaria (aproximadamente 30 h en *M. smegmatis*). Se inocularon dos mililitros del pre-cultivo en 200 mL del mismo medio y se cultivó en agitación a 37 °C hasta alcanzar una D.O.₆₀₀ de 0,8-1,0. A continuación, se enfrió el cultivo en hielo durante 1,0-1,5 h y se centrifugó repartido en 4 tubos Falcon de 50 mL a 3000 x g a 4 °C durante 10 min. Se decantó el sobrenadante y se resuspendió el sedimento celular en 200 mL de una solución fría de glicerol 10% (v/v) con Tween 80 al 0,05%(v/v). Este proceso de centrifugación, retirada del sobrenadante y resuspensión en dicha solución se efectuó varias veces reduciendo progresivamente el volumen de cultivo (200 mL, 100 mL y 25 mL). Finalmente, se resuspendieron las células en 1,5 mL de solución y se repartieron en alícuotas de 200 µL que fueron almacenadas a -80 °C hasta su utilización.

3.2.2. Electroporación

A cada alícuota de células competentes se añadió 1 µg del ADN con el que se deseaba transformar. La mezcla se incubó 10 min en hielo, se introdujo en una cubeta de electroporación (Cell Projects), se electroporó (Gene Pulser, Biorad; parámetros de electroporación: 2,5 Kv, 25 µF y 1000 Ω) y se incubó 5 min adicionales en hielo. Se añadió 1 mL de medio 7H9-glicerol-ADC-Tween80 y se incubó en agitación a 37 °C durante 4 h. Por último, la suspensión bacteriana se sembró en medio sólido en presencia de los antibióticos correspondientes.

4. Técnicas de manipulación de ADN

Las técnicas de manipulación de ADN y otras técnicas de biología molecular utilizadas en este trabajo se describen en Sambrook y Russell (2001). Las endonucleasas de restricción fueron suministradas por New England Biolabs y Takara. Las enzimas *Taq* polimerasa y la *Pfu* polimerasa fueron suministradas por Biotools B.M. Labs y la Phusion polimerasa por New England Biolabs. Todas las enzimas se emplearon atendiendo a las especificaciones de los fabricantes. Los fragmentos de ADN se purificaron mediante los kits *GeneClean Turbo* (Q-BIOgene) o *High Pure PCR Product Purification Kit* (Roche). El ADN genómico de bacterias gram-negativas se purificó con el kit comercial *Bacteria Genomic Prep Mini Spin Kit* (GE HealthCare).

4.1. Electroforesis de ADN en geles de agarosa

Para visualizar los fragmentos de ADN se utilizaron geles de agarosa al 0,7% o al 1,5% en tampón TAE (Tris-HCl 40 mM, ácido acético 20 mM (Sigma), EDTA 2 mM (Sigma), pH 8,1). Se añadió a las muestras $\frac{1}{4}$ de su volumen de una solución compuesta por Ficoll 400 al 30% (p/v) (Sigma), azul de bromofenol al 0,2% (p/v) (Sigma), xilencianol al 0,2% (p/v) (Sigma) y EDTA 40 mM pH 8,0. La electroforesis se realizó a 100 V durante 15-20 min utilizando el tampón TAE como electrolito. Los geles de agarosa se tiñeron con GEL-RED™ (Biotium) y a continuación, el ADN se visualizó con radiación ultravioleta en un transiluminador (Gel Doc™, Bio-Rad). Como marcadores de masa molecular se utilizó *Quick-Load® 100 bp DNA Ladder* (New England Biolabs), el ADN del fago λ digerido con la enzima de restricción *BstEII* (Amersham), o la forma replicativa del fago Φ X174 digerida con *HaeIII* (New England Biolabs).

4.2. Extracción de ADN genómico de micobacterias

Para realizar la extracción de ADN genómico de micobacterias, se utilizó la biomasa procedente de un cultivo de 10 mL en medio rico. Se centrifugó el cultivo, se resuspendió en 400 μ L de TE (Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM, pH 7,5) y se incubó a 80 °C durante 20 min. Se dejó enfriar a temperatura ambiente, se añadió 50 μ L de lisozima (10 mg mL⁻¹) y se incubó a 37 °C durante 1-12 h. A continuación, se añadió 75 μ L de una solución enzimática (SDS 10%; proteinasa K 0,7 mg mL⁻¹) y se incubó a 65 °C durante 10 min. Se adicionó 100 μ L de NaCl 5 M y 100 μ L de CTAB/NaCl precalentado a 65 °C y, se incubó la mezcla a 65 °C durante 10 min. Seguidamente se añadió 750 μ L de cloroformo/alcohol isoamílico (24:1) (Merck), se mezcló con agitación y se centrifugó 5 min a 14000 x g. La fase acuosa se transfirió a un tubo eppendorf y se añadió un volumen equivalente de fenol/cloroformo/isoamílico (25:24:1), se mezcló con agitación y se centrifugó 5 min a 14000 x g. Se recuperó la fase acuosa y se transfirió a un nuevo eppendorf, donde se precipitó el ADN con 0,6 volúmenes de isopropanol y centrifugando durante 15 min a 14000 x g a 4 °C. El sedimento, que contenía el ADN extraído, se lavó un par de veces con etanol al 70% y se resuspendió en 40-100 μ L de TE o H₂O estéril.

4.3. Aislamiento de ADN plasmídico en *E. coli* y *M. smegmatis*

La extracción de ADN plasmídico de células de *E. coli* se realizó con el kit *High Pure Plasmid Purification Kit* (Roche). El aislamiento de ADN plasmídico de *M. smegmatis* se efectuó para verificar la presencia y/o integridad del plásmido en las células transformadas que presentaban resistencia al marcador de selección. A consecuencia de la baja eficiencia de la lisis celular y el bajo número de copias del plásmido de expresión de micobacterias usado en este trabajo, fue necesario extraer el ADN total (ADN genómico y plasmídico) de las cepas recombinantes y retro-transformar con él células competentes de *E. coli*. A continuación, se seleccionaron las células de *E. coli* portadoras del plásmido y se extrajo su ADN plasmídico para verificar su integridad.

4.4. Reacción de amplificación en cadena con ADN polimerasa termorresistente (PCR)

La amplificación del ADN se realizó en un equipo Mastercycler Gradient (Eppendorf) y se utilizaron las enzimas ADN polimerasa I y/o *Pfu* polimerasa (Biotools B. M. Labs). Alternativamente, se empleó la enzima de alta fidelidad Phusion polimerasa (New England Biolabs). Las mezclas de reacción contenían dNTPs 0,25 mM y DMSO 5%. Los productos amplificados se purificaron con el sistema *High Pure PCR Product Purification Kit* (Roche).

4.5. PCR de colonia o de cultivo líquido en *E. coli* y *M. smegmatis*

Para comprobar de manera rápida que las células bacterianas habían incorporado la construcción deseada (por ejemplo, un vector de expresión), se amplificó por PCR una región de ADN de la misma utilizando directamente células enteras. En el caso de *E. coli*, se resuspendió directamente una pequeña cantidad de biomasa de la colonia que se deseaba analizar en la mezcla de reacción de PCR y se llevó a cabo el protocolo de amplificación habitual. En el caso de *M. smegmatis*, se utilizó una pequeña cantidad de biomasa de una colonia o la biomasa obtenida por centrifugación de 100 µL de un cultivo líquido en fase exponencial. La biomasa obtenida se resuspendió en 50 µL de TE, se incubó durante 20 min a 80 °C y se añadió (1-5 µL) a la mezcla de reacción de PCR.

4.6. Secuenciación de ADN

La secuenciación de ADN se llevó a cabo en el Servicio de Secuenciación Automática de ADN (SSAD) del Centro de Investigaciones Biológicas (CIB) (Secugen, S.L.) utilizando un secuenciador automático modelo ABI Prism 3730 (Applied Biosystems). Para la reacción de secuenciación se utilizó el *Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit* de Applied Biosystems, y la ADN polimerasa AmpliTaq FS, de acuerdo con las recomendaciones del proveedor. Las reacciones de amplificación se llevaron a cabo mediante la técnica de PCR con un termociclador *Gene Amp PCR System 2400* de Perkin-Elmer.

4.7. Diseño de genes sintéticos

Para la clonación del gen que codifica la proteína 17 β -HSD del hongo *Cochliolobus lunatus* (Rizner *et al.*, 1999), se optimizó el uso de codón de la secuencia génica para la expresión en *Mycobacterium* (Anexo 1) y se sintetizó químicamente (ATG:biosynthetics Gmb, Alemania). La optimización del uso de codón se llevó a cabo utilizando el programa OPTIMIZER (Puigbò *et al.*, 2007) y la tabla de uso de codón de la base de datos de KDRI (*Codon usage database, Kazusa DNA Research Institute*, Japón). El gen sintético se recibió clonado en el sitio de restricción *EcoRV* del vector comercial pUC57. Posteriormente, fue subclonado en el vector pMV261 mediante digestión con *EcoRI* y *HindIII*, generando el plásmido pHSDCL (Tabla 8).

4.8. Construcción de cepas mutantes de *M. smegmatis* mc²155 mediante delección por recombinación homóloga

La construcción de cepas mutantes de delección génica se realizó mediante doble recombinación homóloga utilizando el plásmido suicida pJQ200x (Jackson *et al.*, 2001). Este vector no replicativo en micobacterias presenta tres marcadores de selección: un gen de resistencia a gentamicina; un gen *sacB*, que codifica la levansacarasa de *B. subtilis* cuya expresión es letal para la bacteria en presencia de sacarosa; un gen *xylE*, que codifica una catecol-2,3-dioxigenasa que transforma el catecol en un compuesto de coloración amarilla denominado 2-hidroxi-mucónico semialdehído. En la Figura 7 se representa la construcción de un mutante particular (cepa MS2868).

En primer lugar, se amplificó por PCR dos fragmentos de aproximadamente 600 pb, uno en posición 5' al gen a mutar (fragmento UP, utilizando los oligonucleótidos UP_F y UP_R correspondientes) y otro en posición 3' (fragmento DOWN, usando los oligonucleótidos DOWN_F y DOWN_R correspondientes). Ambos fragmentos se fusionaron en un único fragmento de ADN (fragmento UP+DOWN), que fue utilizado para efectuar la delección génica. Para llevar a cabo esta estrategia de clonación, los oligonucleótidos presentaban en su extremo 5' determinadas secuencias de reconocimiento por enzimas de restricción; de este modo, los oligonucleótidos UP_F y DOWN_R contenían secuencias que permitieron su clonación en el vector de destino y los oligonucleótidos UP_R y DOWN_F presentaban la misma secuencia de restricción (o al menos dos secuencias que eran compatibles). Después de amplificar los fragmentos UP y DOWN, los dos productos de PCR se digirieron con la enzima de restricción común (o las enzimas compatibles) y se efectuó una ligación equimolar de los mismos con la T4 ADN ligasa (New England Biolabs). A continuación, se amplificó por PCR el fragmento UP+DOWN utilizando los oligonucleótidos externos correspondientes (UP_F y DOWN_R) y como ADN molde distintas cantidades de la ligación anterior (1-3 μ L). El producto de PCR correspondiente fue purificado, digerido con las enzimas de restricción adecuadas y clonado en el plásmido pJQ200x utilizando como huésped de clonación *E. coli* DH10B.

A continuación, 1 μ g del plásmido pJQ200x conteniendo el correspondiente fragmento UP+DOWN fue electroporado en la cepa micobacteriana a mutar, siguiendo el protocolo anteriormente descrito. En una primera etapa, los transformantes fueron seleccionados en placas de medio 7H10 con Gm (5 μ g mL⁻¹). Posteriormente se seleccionaron aquellas colonias que además de ser resistentes a gentamicina, eran sensibles a sacarosa (ausencia de crecimiento en placas de 7H10-sacarosa 10% (p/v)) y daban una

coloración amarilla cuando se adicionaba a la colonia 10-15 μ L de catecol. Estas colonias habían sufrido una primera recombinación homóloga (simple) y presentaban integrado el vector completo en el cromosoma. Para forzar una segunda recombinación homóloga, se seleccionó una colonia y se cultivó en 10 mL de medio 7H9-glicerol-ADC hasta alcanzar una D.O.₆₀₀ de 0,8-1,0. Se sembraron diluciones de 10^{-2} de dicho cultivo en una placa de 7H10 y en una placa de 7H10-sacarosa. En la placa con sacarosa se obtuvieron tres o cuatro órdenes de magnitud menos de colonias, indicando que la segunda recombinación homóloga ha tenido lugar en parte de la población bacteriana. Las colonias resistentes a sacarosa fueron replicadas en placas de 7H10 con Gm y en placas de 7H10 para verificar que, además de la pérdida de toxicidad a sacarosa, también se ha perdido la resistencia a gentamicina. Estas colonias presentaban dos genotipos posibles: silvestre (original) o mutante por doble recombinación homóloga. Por ello, fue necesario llevar a cabo un análisis por PCR utilizando distintas parejas de cebadores que generasen productos de amplificación diferentes para distinguir ambos genotipos.

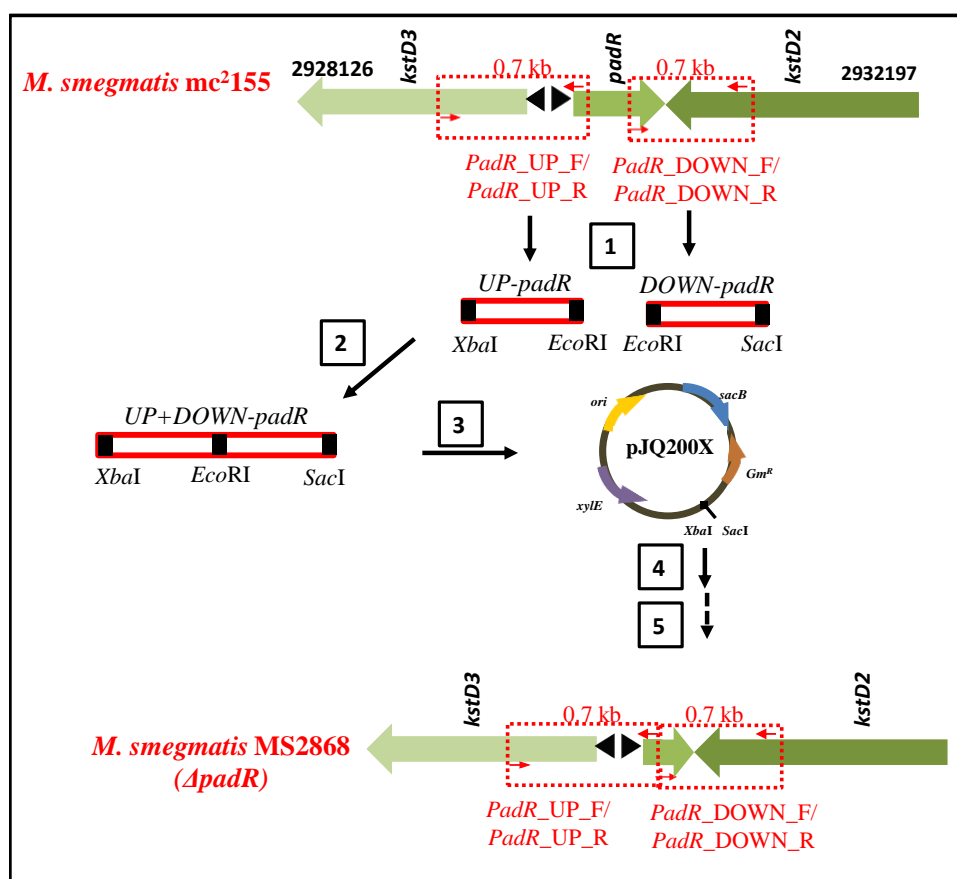


Figura 7. Representación esquemática de la aproximación seguida para la obtención de mutantes de delección génica de micobacterias mediante el uso de vector suicida pJQ200x. Se muestra la construcción del mutante de delección génica *M. smegmatis* MS2868 ($\Delta padR$). El proceso consta de las siguientes etapas: (1) amplificación mediante PCR de los fragmentos *UP-padR* y *DOWN-padR*; (2) amplificación mediante PCR del fragmento *UP+DOWN-padR*; (3) clonación *UP+DOWN-padR* en el plásmido suicida pJQ200x; (4) electroporación de micobacteria con el plásmido pJQPadR; (5) obtención del mutante de delección génica después de varias etapas de selección y contraselección.

5. Técnicas de manipulación de ARN

5.1. Extracción de ARN de micobacterias

El aislamiento de ARN de micobacterias se realizó a partir de cultivos en medio mínimo con una única fuente de carbono y energía (p. ej., glicerol 18 mM o el esteroide deseado a una concentración de 1,8 mM). Se recogieron 15 mL de cultivo en fase exponencial (D.O.₆₀₀ de 0,6-0,8), se pusieron en hielo y se centrifugaron a 4 °C durante 5 min a 4000 x g. Tras descartar el sobrenadante, el sedimento de células se conservó a -80 °C hasta su uso. Para la purificación del ARN total, las células se resuspendieron en 700 µL de solución Kirby (fórmula por 100 mL de solución: 15 mL de SDS 10%, 48 mL de EDTA 0,5 M y 87 mL de H₂O) y 300 µL de lisozima (50 mg mL⁻¹) (Sigma). La mezcla se transfirió a un tubo Falcon de 15 mL al que se había añadido previamente bolas de vidrio (diámetro de 150-212 µm, Sigma), se agitó con vórtex y se incubó a temperatura ambiente durante 5 min. Se añadieron 200 µL de FCIA (fenol-cloroformo-alcohol isoamílico), se mezcló durante 1,5 min con vórtex y se incubó 2 min en hielo. Se adicionaron 800 µL de solución RLT (Qiagen) y se incubó la suspensión durante 10 min en hielo. Se añadió 1,4 mL adicionales de FCIA y se realizaron de nuevo dos pasos secuenciales de agitación durante 1,5 min seguido de incubación en hielo durante 2 min. Las muestras se centrifugaron a 4 °C durante 5 min a 13000 x g, se recuperaron los sobrenadantes y se trasvasaron a nuevos tubos Falcon conteniendo 700 µL de etanol absoluto (Merck). El ARN total de los extractos celulares obtenidos se purificó con el *Rneasy kit* (Qiagen). Las muestras se eluyeron en 30 µL de H₂O estéril y se procesaron con un segundo kit para eliminar el ADN residual (*DNAse and Removal treatment kit*, Ambion). El ARN total extraído se cuantificó utilizando un NanoPhotometer®Pearl (Implen, GmbH) y su integridad se comprobó en geles de agarosa al 1,5 %. Las muestras de ARN se conservaron a -80 °C hasta su posterior uso.

5.2. Retrotranscripción seguida de reacción de PCR (RT-PCR semicuantitativa)

El ADN complementario (ADNc) se sintetizó en una reacción de retrotranscripción mediada por la transcriptasa reversa SuperScript™ II (Invitrogen). Cada mezcla de reacción contenía (20 µL): 1 µg de ARN, 200 U de transcriptasa reversa, ditiotretitol (DTT) 10 mM, dNTPs 0,5 mM y 5 mM de hexámeros al azar (*pd(N)6 random hexamer 5 phosphate*, Amersham Biosciences). El ARN y los hexámeros se incubaron primero a 65 °C durante 5 min para favorecer la hibridación de los mismos y después se añadieron el resto de los componentes de la mezcla. La reacción de retrotranscripción se llevó a cabo a 42 °C durante 2 h y se inactivó calentando durante 15 min a 70 °C. Para verificar que las muestras no presentaban contaminación por ADN genómico, se realizaron controles sin retrotranscriptasa (RT-) para cada una de las muestras.

El ADNc obtenido en el proceso anterior se utilizó como molde en reacciones de PCR semicuantitativas. Los oligonucleótidos requeridos en cada caso se utilizaron a una concentración final de 0,5 µM y se añadió 1 U de la ADN polimerasa I (Biotools) en un volumen final de reacción de 50 µL. El número de ciclos de amplificación fue en todos los casos de entre 25 y 30.

6. Técnicas de manipulación de proteínas

6.1. Obtención de extractos proteicos en *Mycobacterium*

Los extractos proteicos de *Mycobacterium* se prepararon a partir de 10 mL de cultivo (D.O.₆₀₀ 3-4). Los cultivos se centrifugaron, lavaron dos veces con solución salina (NaCl 0,9%) y resuspendieron en 500 µL de solución tampón (p. ej., Tris-HCl 25 mM, pH 7). Las muestras se sonicaron en un equipo Branson 150, aplicando varios pulsos de 30 s y refrigerando las muestras en hielo entre pulsos para prevenir la desnaturalización de las proteínas. Las fracciones proteicas soluble e insoluble de las muestras se separaron por centrifugación a 4 °C durante 10 min a 14000 x g. La concentración de proteína total en la fracción soluble fue determinada mediante el método de Bradford (Bradford, 1976) y se utilizó una recta patrón elaborada con albúmina de suero bovino (BSA) para la cuantificación proteica.

6.2. Electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS (PAGE-SDS)

Las electroforesis analíticas de proteínas se realizaron en geles de poliacrilamida 12,5% (PAGE) en presencia de dodecilsulfato sódico (SDS) (Laemmli, 1970). Se llevaron a cabo temperatura ambiente empleando un electrolito de la siguiente composición: Tris-HCl 25 mM (pH 8); glicina 192 mM y SDS 0,1%. Las muestras se hirvieron durante 10 min en presencia de tampón de ruptura: Tris-HCl 250 mM (pH 6,8); SDS 2%; β-mercaptoetanol 5%; glicerol 10% y azul de bromofenol 0,05%. Se utilizó Coomassie Brilliant Blue R250 para la tinción (Swank y Munkres, 1971) y el *BlueStar Plus Prestained Protein Ladder* (NIPPON Genetics EUROPE GmbH) como marcador de tamaño molecular.

7. Técnicas cromatográficas

7.1. Extracción de esteroides

La extracción de esteroides se llevó a cabo directamente a partir de alícuotas de cultivo (400-500 µL). Las muestras se trataron dos veces con cloroformo (0.5:1, v/v; Merck) y la extracción se favoreció agitando la mezcla con vórtex durante 1 min. La separación de las fases acuosa y orgánica se consiguió por centrifugación a 13000 x g durante 5 min. Se recuperó la fase orgánica y se evaporó a 70 °C en tubos Eppendorf de 2 mL. La muestra se resuspendió en 40-100 µL de acetonitrilo (Scharlau), se centrifugó a 13000 x g durante 5 min y se recuperó el sobrenadante que contenía los esteroides para su posterior análisis por métodos cromatográficos. En aquellas muestras en las que se utilizó un patrón interno para corregir errores de extracción, éste se adicionó en cantidades constantes antes de la extracción líquido-líquido de las muestras.

7.2. Cromatografía en capa fina (TLC)

La cromatografía en capa fina se utilizó para el análisis de esteroides en los distintos ensayos de crecimiento y de biotransformación microbiana. Las placas de TLC se recortaron dejando 1 cm de margen en cada lado, 8 cm de carrera hasta el frente y 1 cm de separación entre muestras (Silica gel 60 F254 20 x 20 cm, Merck). En cada punto de aplicación de la placa, se cargó 10-15 µL de muestra con esteroide

(previamente extraída) y se utilizó como fase móvil o eluyente una mezcla de hexano:acetato de etilo (10:4) (Merck). Los productos esteroideos se visualizaron en luz ultravioleta y/o después del revelado con una solución del 20% de H₂SO₄ (v/v) a 110 °C.

El desarrollo de los cromatogramas se realizó por el método ascendente, es decir, permitiendo que el eluyente ascendiera por la placa por la acción de la capilaridad. La cromatografía se realizó en una cubeta de electroforesis.

7.3. Cromatografía líquida

Los esteroides 4-androsten-3,17-diona (AD), androsta-1,4-dien-3,17-diona (ADD), 9 α -hidroxi-4-androsten-3,17-diona (9OH-AD) y testosterona (TS) fueron determinados por HPLC en fase reversa usando una columna Teknokroma mediterranea™ Sea₁₈ (15 cm x 0.46 cm; 5 μ M) y la detección UV fue realizada a 240 nm. La fase móvil presentaba una mezcla de metanol (Scharlau) y H₂O (75/25, v/v) y un flujo de 0,85 mL min⁻¹. Se utilizaron estándares de los distintos esteroides para cuantificar las muestras (ver Tabla 11).

8. Análisis bioinformáticos

En la Tabla 10 se muestran los programas y herramientas bioinformáticas utilizadas en esta Tesis Doctoral, junto con una descripción acerca de su aplicación y una referencia.

Tabla 10. Software bioinformático empleado en este trabajo.

Nombre	Aplicación	Referencia
OligoAnalyzer 3.1	Predicción de formación de estructuras secundarias y horquillas en oligonucleótidos	Integrated DNA Technologies (IDT) https://eu.idtdna.com/calc/analyzer ,
Primer-BLAST	Diseño de oligonucleótidos frente a una secuencia nucleotídica dada y opcional búsqueda BLAST	National Center for Biotechnology Information (NCBI) http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/
Tm Calculator	Cálculo de T _m de oligonucleótidos	ThermoFisher Scientific https://www.thermofisher.com
Optimizer	Optimización de uso de codón	Puigbò <i>et al.</i> , 2007 http://genomes.urv.es/OPTIMIZER/
NEBcutter V2.0	Identificación de secuencias de reconocimiento de enzimas de restricción comerciales de tipo II y tipo III	New England Biolabs http://nc2.neb.com/NEBcutter2/
SnapGene Viewer	Creación y/o visualización de plásmidos o agrupaciones génicas	Snapgene http://www.snapgene.com/
BioEdit v7.2.5.	Alineamiento y análisis de secuencias	Tom Hall, Ibis Biosciences

Nombre	Aplicación	Referencia
MUSCLE (Multiple Sequence Comparison by Log-Expectation)	Alineamientos de secuencias nucleotídicas	European Bioinformatic Institute (EMBL-EBI) http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/muscle/
Clustal Omega	Alineamientos múltiples de proteínas	European Bioinformatic Institute (EMBL-EBI) http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/
Compute pI/Mw	Determinación de pesos moleculares de proteínas	ExPASy http://web.expasy.org/compute_pi/
MEGA (Molecular Evolutionary Genetics Analysis)	Análisis de secuencias de ADN y proteínas de especies y poblaciones microbianas. Construcción de árboles filogenéticos	Kumar <i>et al.</i> , 2016 Versión 7.0.
PROSITE	Búsqueda de dominios conservados en secuencias proteicas	ExPASy http://prosite.expasy.org/
BLAST	Búsqueda de similaridad entre secuencias biológicas (BLASTn, BLASTp y variantes)	National Center for Biotechnolgy Information (NCBI) http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi

9. Biotransformaciones de esteroides

9.1. Protocolo de disolución de esteroides

Los esteroides son compuestos altamente hidrofóbicos. La obtención de disoluciones homogéneas en medios acuosos, que faciliten el seguimiento por turbidimetría del crecimiento de los cultivos bacterianos, requiere de la adición de agentes solubilizantes especiales. Existen diversas alternativas para conseguir dicho propósito; en este trabajo, se ha utilizado el detergente Tyloxapol o metil- β -ciclodextrinas en los distintos experimentos.

Para la disolución de esteroides en el detergente Tyloxapol (Sigma), se utilizó 10% (v/v) de Tyloxapol y una concentración final de esteroide de 5 mM. Las soluciones se sonicaron en un baño a 80 °C y se autoclavarón una o más veces hasta la completa solubilización de los esteroides. La concentración de Tyloxapol en los medios de cultivo fue en todos los casos igual o inferior al 3,6%.

Para la disolución de esteroides en metil- β -ciclodextrinas (TRMB-T *Randomly Methylated BCD*, CTD Inc.) (Klein *et al.*, 1995), se utilizó una concentración de β -ciclodextrinas de 51,5 mM y de esteroide de 5 mM. La mezcla fue preparada en tampón fosfato salino (PBS) y agitada a 80 °C hasta su completa solubilización. La disolución final se esterilizó por filtración. La concentración de ciclodextrinas en los medios de cultivo fue en todos los casos de 18,5 mM. A diferencia del Tyloxapol, las ciclodextrinas pueden ser utilizadas por *M. smegmatis* como fuente de carbono y energía (a las concentraciones utilizadas en los ensayos puede suponer un incremento en la D.O.₆₀₀ de 0,3-0,5).

Tabla 11. Esteroides empleados en este trabajo.

Esteroides	Proveedor	Número CAS
Colesterol	Sigma (Ref.: C8503)	57-88-5
4-Colesten-3-ona	Sigma (Ref.: 188174)	601-57-0
4-Androsten-3,17-diona	TCI (Ref.: A0845)	63-05-8
Androsta-1,4-dien-3,17-diona	TCI (Ref.: A0856)	897-06-3
9 α -Hidroxi-4-androsten-3,17-diona	Gadea Biopharma S.L.U.	560-62-3
Testosterona	Sigma (Ref.: 86500)	58-22-0
Progesterona	Sigma (Ref.: P0130)	57-83-0
Cortisona	Sigma (Ref.: C2755)	53-06-5
Prednisona	Sigma (Ref.: P6254)	53-03-2
β -Estradiol	Sigma (Ref.: E8875)	50-28-2
Ácido desoxicólico	Sigma (Ref.: D2510)	83-44-3

9.2. Ensayos de crecimiento

En este trabajo se utilizaron ensayos de crecimiento estándar para determinar la capacidad de *Mycobacterium* sp. de utilizar determinados esteroides como única fuente de carbono y energía. Para ello, se prepararon pre-cultivos en medio rico 7H9 de las distintas cepas de trabajo y se utilizaron para inocular nuevos cultivos en medio mínimo. La composición estándar del medio de crecimiento fue la siguiente: medio mínimo 7H9 1x, esteroide a una concentración de 1,8 mM (sustrato), y Tyloxapol 3,6 %. Todos los cultivos se ensayaron a la temperatura de crecimiento óptima (30 ó 37 °C) en un agitador orbital a 200 rpm y se inocularon a una D.O.₆₀₀ de 0,05.

9.3. Biotransformaciones en *resting-cell*

En esta Tesis Doctoral se utilizaron los cultivos en *resting-cell* para llevar a cabo biotransformaciones sencillas, es decir, transformaciones de esteroides que involucren una única etapa enzimática (p.ej., producción de TS a partir de AD). Para ello, se realizaron pre-cultivos en medio rico 7H9 con las distintas cepas de trabajo que se utilizaron para inocular nuevos cultivos de mayor volumen para generar biomasa. Al cabo de 24 h, se centrifugaron los cultivos a 5000 x g durante 20 min y se eliminaron los sobrenadantes. Los sedimentos celulares se resuspendieron en un medio de biotransformación cuya composición estándar fue: tampón fosfato 0,1 M pH 8, esteroide 2 mM (sustrato) y Tween 80 0,05%. Los esteroides se incorporaron al medio de transformación como una solución de esteroide: β -ciclodextrinas con una relación molar 1:10,3. En algunos ensayos se adicionó una fuente de carbono y energía al medio (p. ej., glucosa 1%; Merck). La densidad óptica final de los cultivos en *resting-cell* dependió del ensayo (D.O.₆₀₀ 5-18). Todos los cultivos se ensayaron a 37 °C en un agitador orbital a 200 rpm. En la Fig. 8A se representa un esquema con las distintas etapas de una biotransformación en *resting-cell*.

9.4. Biotransformaciones en crecimiento

En este trabajo se utilizaron los cultivos en crecimiento para llevar a cabo biotransformaciones de esteroides que involucren más de una etapa enzimática (p.ej., producción de TS a partir de esteroides). Se prepararon pre-cultivos en medio rico 7H9 de las distintas cepas de trabajo y se utilizaron para inocular

nuevos cultivos en los que el crecimiento microbiano y la biotransformación del sustrato fueron simultáneos. La composición estándar del medio de biotransformación fue la siguiente: medio mínimo 7H9 1x, colesterol 1,8 mM (sustrato), glicerol 18 mM (fuente de carbono y energía mayoritaria) y Tyloxapol 3,6 %. En algunos ensayos se utilizaron fuentes de carbono y energía distintas (p. ej., glucosa) o concentraciones alternativas (p. ej., glicerol 1%) y/o se realizaron adiciones de fuentes de carbono a distintos tiempos de la fermentación (p. ej., glucosa 1% a las 24 h de cultivo). Todos los cultivos se ensayaron a 37 °C en un agitador orbital a 200 rpm y se inocularon a una D.O.₆₀₀ de 0,05. En la Fig. 8B se muestra un esquema de una biotransformación en crecimiento.

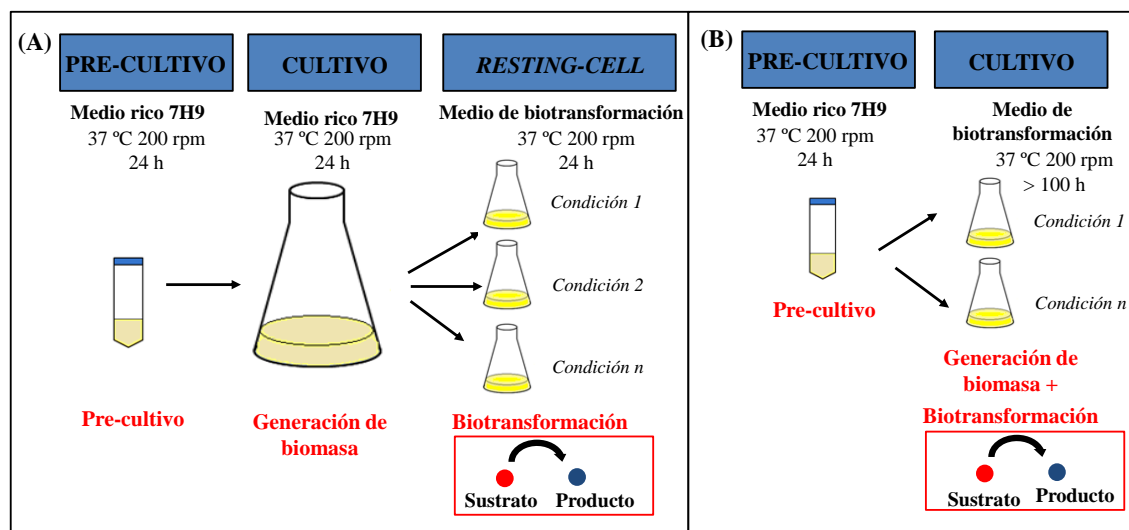


Figura 8. Representación esquemática de la aproximación seguida para llevar a cabo biotransformaciones bacterianas de esteroides. (A) Biotransformación en *resting-cell*. (B) Biotransformación en crecimiento.

VI. RESULTADOS

1. Descubrimiento de una ruta alternativa para la degradación de esteroides C-19

En numerosos estudios se ha demostrado la existencia de redundancias en las enzimas clave del catabolismo de esteroides en especies de actinobacterias (p. ej., KstD, KSH) (van der Geize *et al.*, 2000, 2001, 2002; Petrusma *et al.*, 2011; Fernández de las Heras *et al.*, 2012). La existencia de múltiples *clusters* génicos involucrados en la degradación de estos compuestos en algunas de estas bacterias, les confiere la capacidad de mineralizar un amplio rango de esteroides (p. ej., esteroides, ácidos biliares, testosterona, progesterona) (van der Geize *et al.*, 2007; Li *et al.*, 2014; Shtratnikova *et al.*, 2016). Resulta curioso que la mayoría de estos estudios hayan sido llevados a cabo en especies de los géneros *Rhodococcus* o *Gordonia* y, no exista apenas información disponible relativa a especies del género *Mycobacterium*. En el Apartado 1 de Resultados de esta Tesis Doctoral se estudiará la mineralización de algunos esteroides androgénicos (p. ej., AD) utilizando como modelo la bacteria *M. smegmatis*, que ha sido extensivamente utilizada en las últimas décadas para el estudio del catabolismo del colesterol en actinobacterias. Los objetivos perseguidos con este trabajo son: (i) análisis de la diversidad y/o distribución de los *clusters* génicos de catabolismo de esteroides en actinobacterias, (ii) identificación de dianas génicas para el diseño de biofactorías celulares para la producción biotecnológica de esteroides, (iii) identificación de nuevas actividades enzimáticas modificadoras de esteroides.

1.1. Descripción del fenotipo C-19+ en *M. smegmatis*: catabolismo de esteroides C-19

1.1.1. Cultivo de *M. smegmatis* en esteroides C-19: el fenotipo C-19+

En numerosas publicaciones se ha descrito la capacidad de *M. smegmatis* mc²155 de utilizar colesterol como única fuente de carbono y energía (Sobel y Plaut, 1949; Av-Gay y Sobouti, 2000; Kendall *et al.*, 2007; Uhía *et al.*, 2012). Sin embargo, la degradación de esteroides C-19 apenas ha sido estudiada en esta bacteria ni en otras micobacterias. En esta Tesis Doctoral se utiliza el término “esteroide C-19” para referirse a esteroides que no presentan cadena lateral en el C-17 y en particular, para referirse a los compuestos 4-androsten-3,17-diona (AD), androsta-1,4-dien-3,17-diona (ADD) y 9 α -hidroxi-4-androsten-3,17-diona (9OH-AD) (Fig. 10D).

Para determinar si *M. smegmatis* mc²155 puede crecer en esteroides C-19, se cultivó en medio mínimo 7H9 con un esteroide a una concentración de 1,8 mM (colesterol, AD, ADD o 9OH-AD) como única fuente de carbono y energía. En las condiciones de cultivo ensayadas, *M. smegmatis* mc²155 sólo fue capaz de crecer en colesterol y no se observó crecimiento en esteroides C-19 incluso después de cuatro días de incubación (Fig. 10A). Asumiendo que la fase de latencia (*lag phase*) de esta bacteria podría ser excepcionalmente más larga para estos compuestos, se expandió el tiempo de cultivo. Gracias a esta extensión, se observó que después de 120 h de incubación en presencia de AD, ADD o 9OH-AD, *M. smegmatis* mc²155 empezaba a crecer eficientemente alcanzando densidades celulares significativamente altas a las 150 h (Fig. 10B). Los cultivos finales crecidos en presencia de esteroides C-19 se usaron como preinóculos de nuevos cultivos en AD, ADD o 9OH-AD. En todos los casos se observó que ya no existía esa fase de latencia tan larga y que por consiguiente las células habían adquirido la capacidad de utilizar eficientemente esteroides C-19 como única fuente de carbono y energía (Fig. 10C);

este comportamiento fue denominado “fenotipo C-19+”.

Para comprobar si el fenotipo C-19+ era estable, las células recolectadas después de 150 h de cultivo en esteroides C-19 se plaquearon en medio de cultivo sólido (LB o 7H10) y se aislaron colonias individuales. A continuación, con estas colonias (“cepas C-19+”) se realizaron varios pases en medios de cultivo rico sólido o líquido (LB o 7H9) en ausencia de esteroides y se comprobó que las células aisladas después de estos pases aún retenían la capacidad de degradar eficientemente esteroides C-19 sin una fase de latencia larga (ver Fig. 10C). También se observó que las células que fueron adaptadas a crecer en un esteroide C-19 particular (p. ej., AD) eran capaces de crecer en otros esteroides C-19 (p. ej., AD, ADD y 9OH-AD) y que retenían la capacidad de crecer en colesterol (Ver Apartado 1.1.9. de Resultados). Estos experimentos de adaptación a la metabolización de los esteroides C-19 se repitieron múltiples veces y siempre se obtuvieron resultados idénticos. En todo momento se descartó la presencia de contaminaciones con otras especies bacterianas secuenciando el gen del ARN ribosómico 16S amplificado por PCR del DNA obtenido de las células recolectadas al final de los cultivos realizados en presencia de esteroides C-19. En la Fig. 9 se representa un esquema del diseño experimental seguido para la obtención de distintas cepas C-19+.

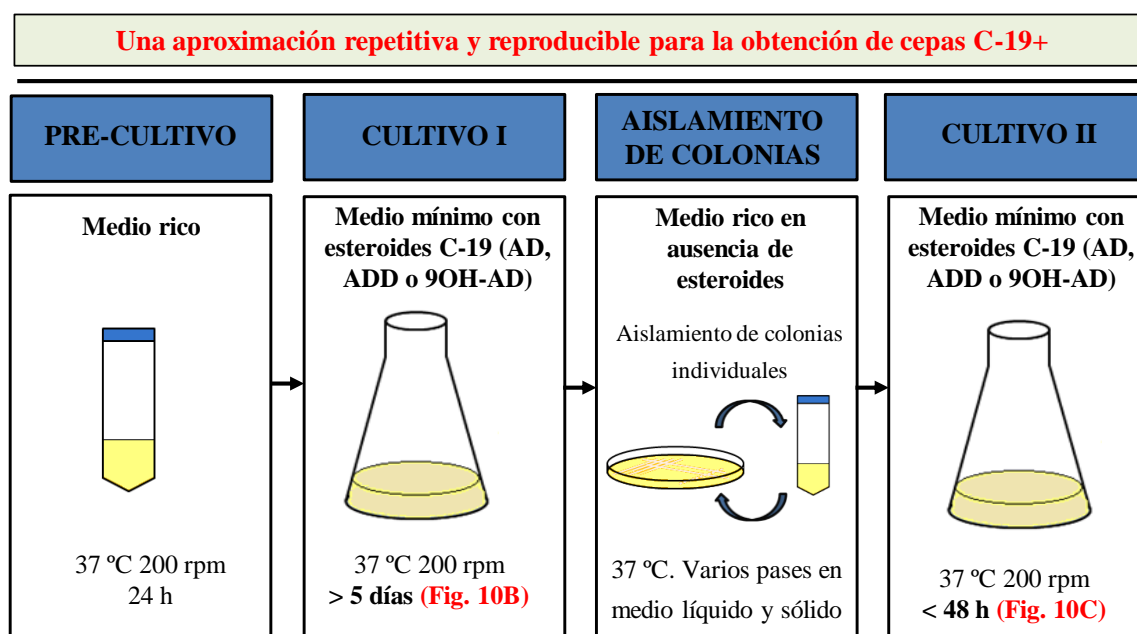


Figura. 9. Representación esquemática de la aproximación seguida para la obtención de cepas C-19+ de *M. smegmatis*. Se trata de un procedimiento repetitivo y reproducible que permite aislar cepas con fenotipo C-19+, es decir, bacterias capaces de utilizar esteroides C-19 como únicas fuentes de carbono y energía de manera eficiente y estable.

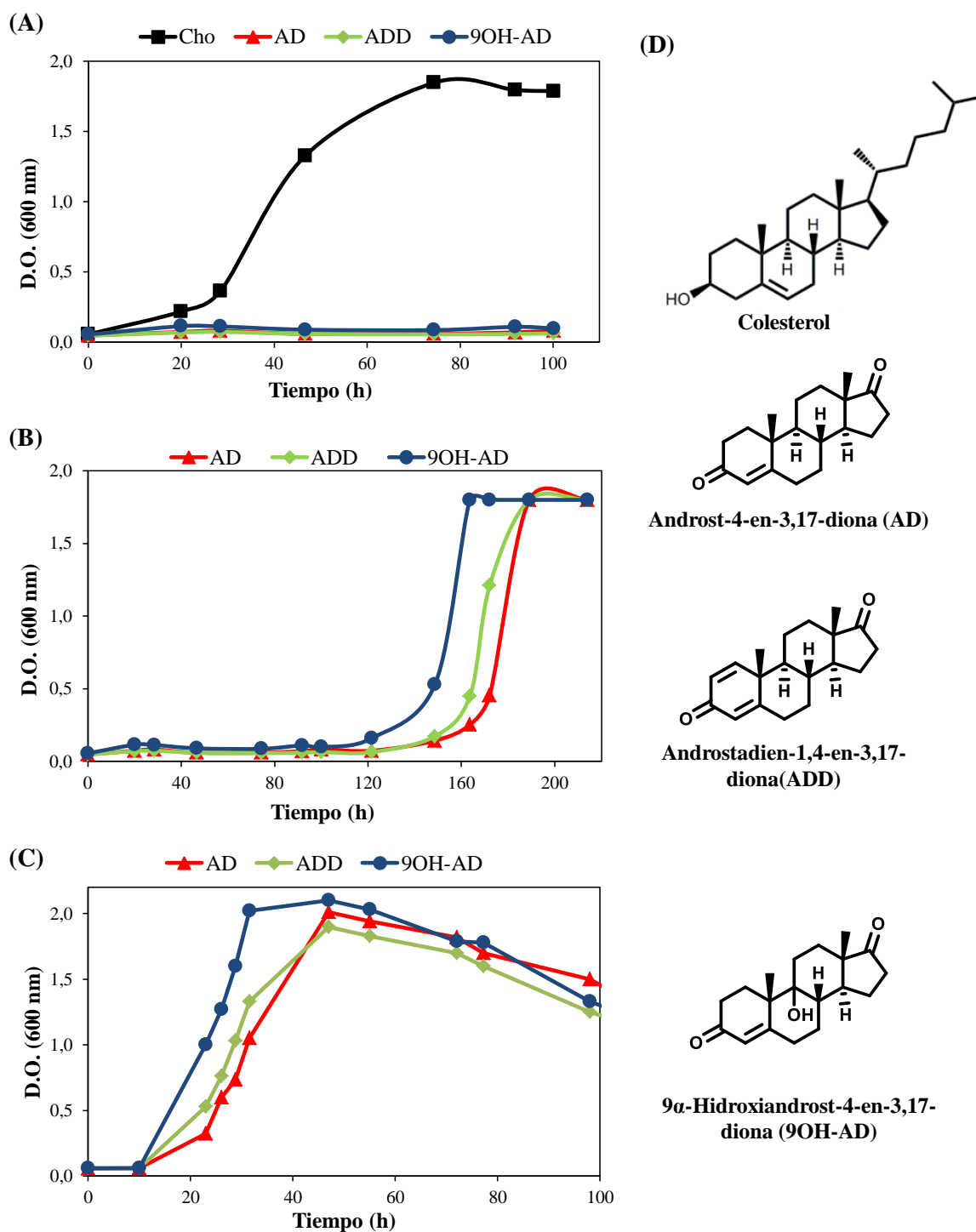


Figura 10. Curvas de crecimiento de cepas de *M. smegmatis* mc²¹⁵⁵ en diferentes esteroides. Las cepas se cultivaron en medio mínimo 7H9 con distintos esteroides a una concentración de 1,8 mM como única fuente de carbono y energía: colesterol (negro), AD (rojo), ADD (verde) o 9OH-AD (azul). **(A)** Crecimiento de *M. smegmatis* mc²¹⁵⁵. **(B)** Adaptación de *M. smegmatis* mc²¹⁵⁵ a esteroides C-19 después de un cultivo de 150 h. **(C)** Crecimiento de las cepas C-19+ de *M. smegmatis* aisladas al final de los cultivos que presentan el fenotipo C-19+. **(D)** Estructura química de moléculas esteroideas.

1.1.2. Descifrando el fenotipo C-19+

Con el objetivo de comprender tanto el origen del fenotipo C-19+ como la incapacidad de la cepa silvestre de *M. smegmatis* de crecer eficientemente en esteroides C-19, se plantearon diversas hipótesis y se realizaron numerosos experimentos que a continuación se detallan.

En primer lugar, se postuló que la cepa silvestre podría no ser capaz de crecer eficientemente en esteroides C-19 debido a limitaciones en el transporte de estos compuestos. Esta hipótesis fue rápidamente descartada sobre la base de múltiples evidencias. Por un lado, en nuestro laboratorio se han llevado a cabo numerosas biotransformaciones en *resting-cell* con esta cepa utilizando esteroides C-19 como sustrato (p. ej., producción de testosterona a partir de AD; ver Apartado 2.2. de Resultados) y se ha observado que estos compuestos son rápidamente transformados y por tanto, transportados. Del mismo modo, con los ensayos de biotransformación para la producción de esteroides C-19 a partir de esteroides descritos en el Apartado 2.1. de Resultados, también se ha comprobado que estos compuestos son capaces de entrar y salir de estas células. Por todo ello, el transporte de esteroides C-19 parece no ser una etapa limitante que explique la incapacidad de la cepa silvestre de degradar eficientemente estos compuestos.

En segundo lugar, se postuló que los esteroides C-19 podrían ocasionar algún efecto tóxico en la cepa silvestre. Diversos autores han sugerido que algunos esteroides (p. ej., AD y ADD) pueden ser tóxicos para las células (van der Geize *et al.*, 2002; Cvelbar *et al.*, 2013) y se han descrito algunos ejemplos en micobacterias (Lee y Liu, 1992; Smith *et al.*, 1993). Sin embargo, en esta Tesis no se ha observado un efecto tóxico significativo de los esteroides C-19 (p. ej., AD, ADD y 9OH-AD) en las cepas de *M. smegmatis* analizadas a nuestras concentraciones de trabajo (rango de 1-2 mM de esteroide). Dicho efecto ha sido por ejemplo estudiado en experimentos de crecimiento en medio mínimo con glicerol 18 mM suplementado con distintas concentraciones de esteroides C-19 (p. ej., AD, 0,5-2 mM) (datos no mostrados).

En tercer lugar, se postuló que el catabolismo del colesterol podría estar más regulado en *M. smegmatis* mc²155 que en otras bacterias degradadoras de esteroides C-19 y que por tanto, estos compuestos sólo podrían ser metabolizados después de la inducción del regulón *kstR* del colesterol. En la Introducción ya se mencionó que el represor KstR, codificado por el gen *MSMEG_6042*, regula a nivel transcripcional este regulón y tiene como inductor un intermediario CoA del catabolismo del colesterol que aún presenta la cadena lateral (García-Fernández *et al.*, 2014; Ho *et al.*, 2016). Para verificar esta hipótesis, se investigó si la cepa mutante $\Delta kstR$ de *M. smegmatis* (Tabla 7), que expresa constitutivamente el regulón *kstR* del colesterol (Kendall *et al.*, 2007, 2010), era capaz de crecer en medio mínimo con esteroides C-19 como única fuente de carbono y energía. Sorprendentemente, esta cepa fue capaz de crecer en AD o ADD pero no en 9OH-AD (Fig. 11). Además, el crecimiento observado en AD o ADD fue diferente al previamente visto en las cepas C-19+ (Fig. 10C), presentando velocidades de crecimiento y densidades ópticas finales (D.O.₆₀₀) significativamente más bajas. Este resultado se pudo en parte explicar tras analizar por cromatografía en capa fina (TLC) los compuestos esteroídicos extraídos del cultivo, donde se observó que la cepa mutante $\Delta kstR$ acumulaba intermediarios esteroideos durante la degradación de AD y ADD (Fig. 12).

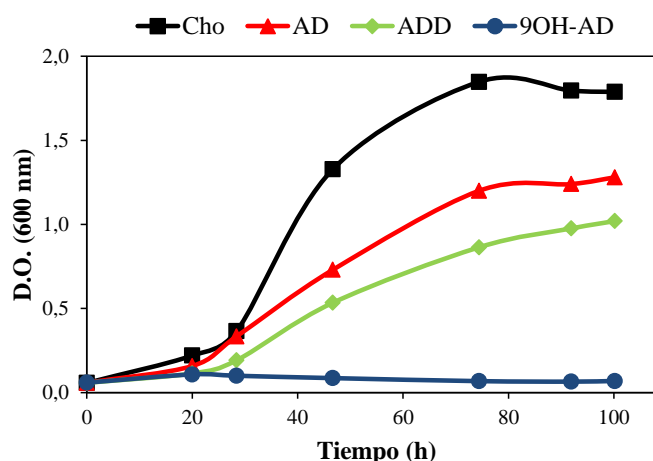


Figura 11. Curvas de crecimiento de *M. smegmatis* Δ kstR en diferentes esteroides. La cepa se cultivó en medio mínimo 7H9 con distintos esteroides 1,8 mM como única fuente de carbono y energía: colesterol (negro), AD (rojo), ADD (verde) o 9OH-AD (azul).

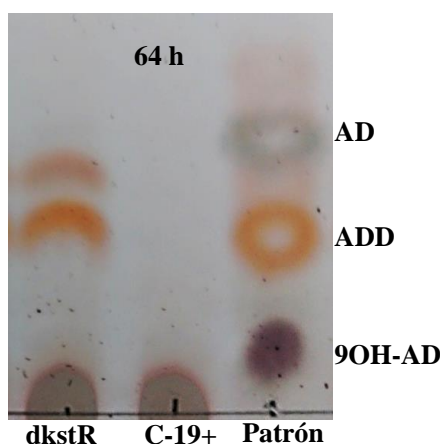


Figura 12. Análisis de intermediarios esteroideos mediante cromatografía en capa fina (TLC). El mutante *M. smegmatis* Δ kstR y una cepa C-19+ (C-19+) fueron cultivados en medio mínimo con AD 1,8 mM como única fuente de carbono y energía. La presencia de intermediarios esteroideos fue analizada en los cultivos por TLC a las 64 h (fase estacionaria temprana).

Por otra parte, para descartar la implicación del regulón *kstR* en el fenotipo C-19+, se analizaron los niveles de transcripción de algunos de sus genes clave (p. ej., *kstD1*, *kshB1*, *kshA1*, *hsaA1*) (Uhía *et al.*, 2012) por RT-PCR semicuantitativa en la cepa silvestre de *M. smegmatis* mc²155 y en una cepa C-19+ concreta (ADD+) (Tabla 7). Para ello, se purificó el ARN total de cultivos crecidos en medio mínimo con colesterol, glicerol o AD como únicas fuentes de carbono y energía. Para analizar la expresión génica en presencia de AD en *M. smegmatis* mc²155, se añadió glicerol para promover el crecimiento microbiano. En ambas cepas, se observó que los niveles de expresión de los genes del regulón *kstR* estaban incrementados significativamente en presencia de colesterol respecto a glicerol o esteroides C-19. Estos resultados indicaban que la regulación del regulón *kstR* no se encontraba alterada en las cepas C-19+ (Fig.13).

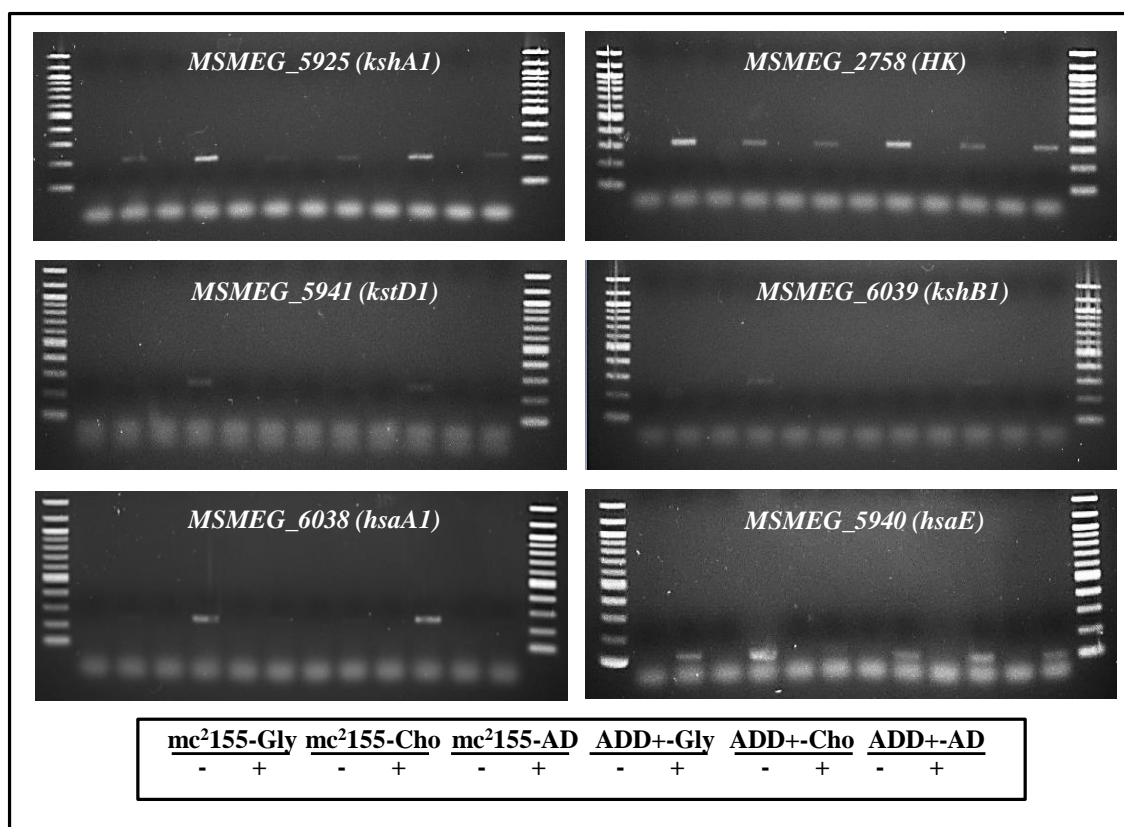


Figura 13. Electroforesis en geles de agarosa 1,5% de los productos de RT-PCR semicuantitativa obtenidos durante el análisis de la expresión génica del regulón *kstR* en las cepas *M. smegmatis* mc²155 y ADD+. Las células utilizadas para la purificación de ARN total se cultivaron en medio mínimo con glicerol 18 mM (Gly), colesterol 1,8 mM (Cho) o AD 1,8 mM (AD) como únicas fuentes de carbono y energía. Para analizar la expresión génica en presencia de AD en la cepa *M. smegmatis* mc²155, se añadió glicerol 18 mM para promover el crecimiento. La extracción de ARN y las reacciones de RT-PCR se realizaron como se indican en el Apartado 5 de los Materiales y Métodos. Las secuencias de los oligonucleótidos empleados se muestran en la Tabla 9. Se utilizó Quick-Load® 100 bp DNA Ladder como marcador de masa molecular (NEB). Se realizaron controles sin transcriptasa reversa para verificar la ausencia de contaminación por ADN genómico (-). Abreviaturas: HK (housekeeping).

En último lugar, se decidió descartar que la incapacidad de *M. smegmatis* mc²155 de crecer en esteroides C-19 es debida a las mutaciones superfluas adquiridas cuando fue obtenida por mutagénesis y seleccionada por presentar eficiencias de transformación mayores que su cepa parental *M. smegmatis* DSM 43465 (ATCC 607) (Snapper *et al.*, 1990; Etienne *et al.*, 2005). Para ello, se estudió si la cepa parental de referencia era capaz de crecer en esteroides C-19 como única fuente de carbono y/o energía. Al igual que *M. smegmatis* mc²155, *M. smegmatis* DSM 43465 tampoco fue capaz de crecer en esteroides C-19 incluso después de cuatro días de incubación y sólo cuando se prolongaron los cultivos durante más de 120 h, se observó un crecimiento significativo y la aparición del mismo fenotipo C-19+ estable previamente descrito (datos no mostrados).

En definitiva, la incapacidad de la cepa silvestre de *M. smegmatis* mc²155 de crecer eficientemente en esteroides C-19 parece no estar relacionada con los aspectos de transporte, toxicidad o regulación arriba mencionados. Estos datos demuestran que los esteroides C-19 no inducen el regulón *kstR* en *M. smegmatis*, así como que la expresión génica basal de este regulón no es suficiente para facilitar el crecimiento en AD o ADD en la cepa silvestre. Por otra parte, a través de la ruta catabólica del

colesterol sólo se logra una degradación parcial de AD o ADD y no se observa metabolización de 9OH-AD. Estos resultados sugerían que otro conjunto de enzima/s está involucrado en la degradación de esteroides C-19 en las cepas C-19+.

1.1.3. Identificación *in silico* y anotación del *cluster* C-19+

Los datos presentados arriba sugerían que las cepas C-19+ metabolizaban los esteroides AD, ADD y 9OH-AD como resultado de la expresión de genes que estaban silentes o de proteínas que eran inactivas en las cepas silvestres. Teniendo en cuenta el papel clave de los genes *kshA*, *kshB* y *kstD* en el catabolismo del colesterol (García *et al.*, 2012), se utilizaron como referencia los genes descritos en *M. tuberculosis* H37Rv y *R. jostii* RHA1 para identificar homólogos en el genoma de *M. smegmatis* mc²155 (Tabla 12).

En estos análisis *in silico* se anotaron dos genes *kshA* (*MSMEG_5925* y *MSMEG_2870*), dos genes *kshB* (*MSMEG_6039* y *MSMEG_2893*) y cinco genes *kstD* (*MSMEG_5941*, *MSMEG_2869*, *MSMEG_4864*, *MSMEG_2867* y *MSMEG_4870*) en el genoma de *M. smegmatis* (Tabla 12). En este sentido, Brzostek *et al.* (2005) ya habían anotado estos cinco genes *kstD* en *M. smegmatis* y un sexto adicional (*MSMEG_5835*). Este último gen fue suprimido en nuestra anotación, porque codifica una proteína con una baja identidad de secuencia (< 20%) que no presenta el dominio N-terminal de unión a FAD característico de las proteínas KstDs, lo que sugiere que podría presentar una actividad enzimática distinta. Por otra parte, los datos previamente publicados señalaban que sólo los genes *MSMEG_5925* (*kshA1*), *MSMEG_5941* (*kstD1*) y *MSMEG_6039* (*kshB1*) forman parte del catabolón del colesterol, pues son los únicos que presentan en sus regiones promotoras un operador KstR consenso y los únicos que se inducían en presencia de colesterol en experimentos de microarrays previos (Tabla 12) (Kendall *et al.*, 2007; Uhía *et al.*, 2012). En los análisis transcripcionales se observó que los niveles de expresión de estos tres genes son similares en la cepa C-19+ y en la cepa silvestre (Fig.13), por lo que posiblemente otros genes *kshA*, *kshB* y/o *kstD* están involucrados en la degradación de esteroides C-19 en las cepas C-19+. Por ello, se decidió realizar un análisis *in silico* en mayor profundidad en torno al resto de genes homólogos anotados.

Como ya se ha comentado en el genoma de *M. smegmatis* sólo se encontró otro posible gen homólogo al gen *kshA1* (*MSMEG_5925*), el gen *MSMEG_2870* (*kshA2*), que podría codificar una KshA2 (386 aa, 43624 Da) con una identidad proteica del 59% a KshA1. Curiosamente, próximos al gen *kshA2*, se localizaron dos posibles genes *kstD* (*MSMEG_2869* y *MSMEG_2867*) que podrían codificar dos KstDs (KstD2 y KstD3) con una identidad proteica del 44% y 36% a KstD1 (*MSMEG_5941*), respectivamente. En torno a ellos, se pudo localizar un *cluster* génico de 50 kb con numerosos genes que codifican enzimas posiblemente relacionadas con el metabolismo de esteroides, entre los que se incluyen el gen anotado como *kshB2* (*MSMEG_2893*) (Tabla 12). Esta región genómica denominada “*cluster* C-19+” (de *MSMEG_2851* a *MSMEG_2901*) (Tabla 14, Fig. 14) fue delimitada mediante análisis comparativos con otras especies micobacterianas (Ver Apartado 1.2.1.). Ninguno de sus genes se inducía en presencia de colesterol en los experimentos de microarrays antes mencionados (Kendall *et al.*, 2007; Uhía *et al.*, 2012) ni contiene secuencias consenso operadoras KstR y/o KstR2 en la región promotora (Kendall *et al.*, 2007; 2010).

A continuación, sobre la base del conocimiento de la ruta catabólica del colesterol propuesta en *M. smegmatis* (García *et al.*, 2012) (Fig. 5), en este *cluster* génico se identificaron genes homólogos para casi todas las etapas enzimáticas involucradas en la modificación de los anillos esteroideos A/B (KstD, KshA, KshB, HsaA, HsaC, HsaD) (Tabla 13). Por ejemplo, se identificaron los genes *MSMEG_2891*, *MSMEG_2892* y *MSMEG_2900* que codifican posibles enzimas HsaC, HsaA y HsaD, respectivamente, y que presentan una identidad proteica considerable con las correspondientes enzimas del catabolismo del colesterol (Tabla 13). No se encontraron proteínas homólogas a HsaB, HsaE, HsaF ni HsaG, ni a las proteínas involucradas en la ruta baja de esteroides (regulón *kstR2*) en esta región genómica ni en ninguna otra parte del genoma de *M. smegmatis*.

Por otra parte, en esta región genómica también se anotaron otros genes que codifican enzimas probablemente relacionadas con la degradación de esteroides, como por ejemplo una enzima esteroide monooxigenasa (SMO) codificada por el gen *MSMEG_2894* que comparte una identidad proteica del 67% con la proteína WP_059384609 de *Rhodococcus rhodochrous*. Esta proteína ha sido descrita como un versátil catalizador capaz de convertir un amplio rango de ceto-esteroides en lactonas usando oxígeno molecular y NADPH (Mori *et al.*, 1999; Leipold *et al.*, 2013). También se anotaron tres reguladores transcripcionales. El gen *MSMEG_2868* codifica un posible regulador de la familia PadR (nº acceso Pfam PF03551) (Fibriansah *et al.*, 2012), el gen *MSMEG_2890* codifica un posible regulador que pertenece a la familia IclR (nº acceso Pfam PF01614) (Molina-Henares *et al.*, 2006) y el gen *MSMEG_2898* codifica un posible regulador de la familia TetR (nº acceso Pfam PF00440) (Cuthbertson y Nodwell, 2013).

Función	Gen ^A	Nombre	Proteína (aa)	Identidad ^B (%)	Identidad ^C (%)	Operador KstR	Fold change ^D
KshA	<i>MSMEG_5925</i>	<i>kshA1</i>	383	82	70	Sí	7,00
	<i>MSMEG_2870</i>	<i>kshA2</i>	386	57	61	No	1,00
KshB	<i>MSMEG_6039</i>	<i>kshB1</i>	353	73	57	Sí	1,88
	<i>MSMEG_2893</i>	<i>kshB2</i>	351	55	64	No	1,21
KstD	<i>MSMEG_5941</i>	<i>kstD1</i>	566	83	68	Sí	13,00
	<i>MSMEG_2869</i>	<i>kstD2</i>	558	44	45	No	-1,17
	<i>MSMEG_2867</i>	<i>kstD3</i>	522	36	36	No	-1,14
	<i>MSMEG_4864</i>	<i>kstD4</i>	587	42	45	No	-1,46
	<i>MSMEG_4870</i>	<i>kstD5</i>	546	36	36	No	-1,35

Tabla 12. Análisis *in silico* del genoma de *M. smegmatis* mc²155.^ALas identificaciones génicas se han realizado sobre la última anotación del genoma de *M. smegmatis* y son distintas a las anotaciones descritas por Brzostek *et al.* (2005). La anotación antigua se muestra a continuación: *kstD1* (*MSMEG5891*; *ksd1*), *kstD2* (*MSMEG2873*), *kstD3* (*MSMEG2871*), *kstD4* (*MSMEG4850*) y *kstD5* (*MSMEG4855*, *ksd2*). Se ha corregido la anotación de *MSMEG_5835* (*MSMEG5801*) como *kstD*, a causa de su baja identidad de secuencia.^BLas identidades fueron establecidas usando las proteínas de *M. tuberculosis* H37Rv como referencia: KshA (*Rv3526*), KshB (*Rv3571*) y KstD (*Rv3537*).^CLas identidades fueron establecidas usando las proteínas de *R. jostii* RHA1 como referencia: KshA (*RHA1_RS2212*, *ro04538*), KshB (*RHA1_RS22120*, *ro05883*) y KstD (*RHA1_RS22090*, *ro04532*).^DEl Fold change fue calculado comparando la expresión génica de *M. smegmatis* en medio de cultivo con colesterol vs. glicerol (Uhía *et al.*, 2012).

Proteína	Función bioquímica	Ruta del colesterol	Cluster C-19
KstD	3-Cetosteroide Δ^1 -deshidrogenasa	MSMEG_5941	MSMEG_2869 (44) MSMEG_2867 (36)
KshA	3-Cetosteroide 9 α -hidroxilasa (subunidad oxigenasa)	MSMEG_5925	MSMEG_2870 (59)
KshB	3-Cetosteroide 9 α -hidroxilasa (subunidad reductasa)	MSMEG_6039	MSMEG_2893 (55)
HsaA	3-Hidroxi-9,10-secoandrosta-1,3,5(10)-trien-9,17-diona monooxigenasa (subunidad oxigenasa)	MSMEG_6038	MSMEG_2892 (40)
HsaB	3-Hidroxi-9,10-secoandrosta-1,3,5(10)-trien-9,17-diona monooxigenasa (subunidad reductasa)	MSMEG_6035	-
HsaC	3,4-Dihidroxi-9,10-secoandrosten-1,3,5(10)-trien-9,17-diona dioxigenasa	MSMEG_6036	MSMEG_2891 (50)
HsaD	Ácido 4,5,9,10-diseco-3-hidroxi-5,9,7-trioxoandrosta-1(10),2-diene-4-oico hidroxilasa	MSMEG_6037	MSMEG_2900 (41)
HsaE	Ácido 2-hidroxi-2,4-hexadienoico hidratasa	MSMEG_5940	-
HsaF	4-Hidroxi-2-cetovalerato aldolasa	MSMEG_5939	-
HsaG	Acetaldehído deshidrogenasa	MSMEG_5397	-

Tabla 13. Identificación *in silico* de genes homólogos involucrados en la modificación de los anillos esteroideos A/B en el genoma de *M. smegmatis* mc²155. Las identidades proteicas se han determinado utilizando como referencia las proteínas de la ruta catabólica del colesterol y se muestran entre paréntesis.

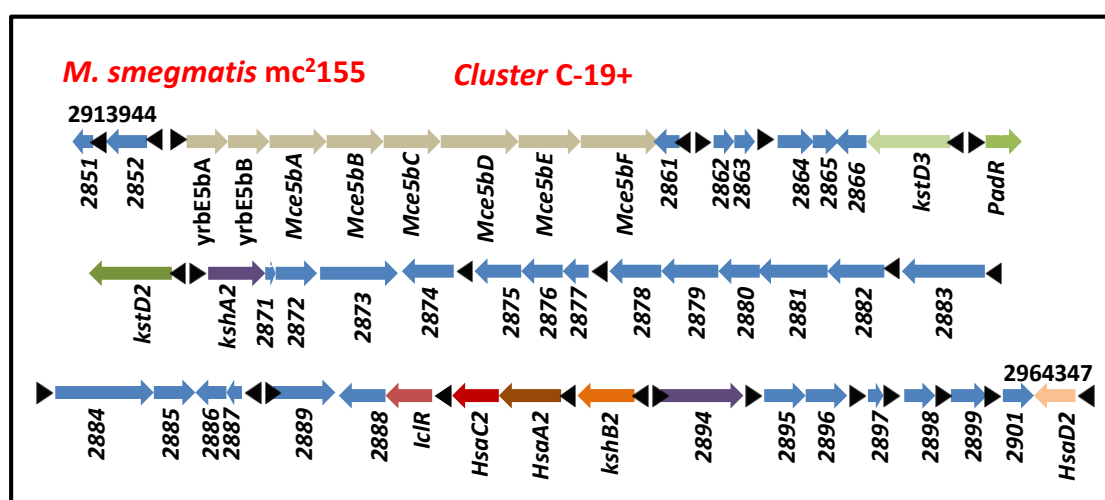


Figura 14. Identificación *in silico* de un posible *cluster* génico involucrado en la degradación de esteroides C-19 en *M. smegmatis* mc²155. Se representa esquemáticamente el *cluster* (*cluster* C-19+) de *M. smegmatis*: los genes y las regiones promotoras anotadas se muestran con flechas y triángulos, respectivamente. La delimitación (MSMEG_2851 a MSMEG_2901; NC_008596.1) se ha efectuado mediante análisis genómicos comparativos con otras especies de micobacterias que presentan un *cluster* similar (*M. vanbaalenii* PYR-1, desde MVAN_RS14310 hasta MVAN_RS14565; *M. neoaurum* DSM 44074, desde TY28_RS11880 hasta TY28_RS12130). Nomenclatura de la anotación génica: MSMEG_(número), *M. smegmatis*.

Gen	Descripción génica	Localización genómica	Función putativa
<i>MSMEG_2851</i>	Proteína hipotética	2913944..2914399, complementaria	
<i>MSMEG_2852</i>	3-Oxoacil-ACP reductasa	2914474..2915304, complementaria	
<i>MSMEG_2853</i>	Proteína hipotética	2915518..2916330	<i>yrbE5bisA</i>
<i>MSMEG_2854</i>	Proteína hipotética	2916342..2917187	<i>yrbE5bisB</i>
<i>MSMEG_2855</i>	Proteína de la familia Mce de factores de virulencia	2917214..2918401	<i>mce5bisA</i>
<i>MSMEG_2856</i>	Proteína de la familia Mce de factores de virulencia	2918398..2919429	<i>mce5bisB</i>
<i>MSMEG_2857</i>	Proteína de la familia Mce de factores de virulencia	2919429..2920505	<i>mce5bisC</i>
<i>MSMEG_2858</i>	Proteína de la familia Mce de factores de virulencia	2920508..2921965	<i>mce5bisD</i>
<i>MSMEG_2859</i>	Proteína de la familia Mce de factores de virulencia	2921962..2923152	<i>mce5bisE</i>
<i>MSMEG_2860</i>	Proteína de la familia Mce de factores de virulencia	2923152..2924639	<i>mce5bisF</i>
<i>MSMEG_2861</i>	Proteína hipotética	2924650..2925162, complementaria	
<i>MSMEG_2862</i>	Proteína hipotética	2925290..2925682	
<i>MSMEG_2863</i>	Proteína hipotética	2925664..2926083	
<i>MSMEG_2864</i>	Proteína hipotética	2926271..2926948	
<i>MSMEG_2865</i>	Proteína hipotética	2926945..2927517	
<i>MSMEG_2866</i>	Tioesterasa	2927518..2928129, complementaria	
<i>MSMEG_2867</i>	3-Cetoesteroide- Δ^1 -deshidrogenasa	2928126..2929694, complementaria	<i>kstD3</i>
<i>MSMEG_2868</i>	Regulador transcripcional de la familia PadR	2929813..2930508	<i>padR</i>
<i>MSMEG_2869</i>	3-Cetoesteroide- Δ^1 -deshidrogenasa	2930521..2932197, complementaria	<i>kstD2</i>
<i>MSMEG_2870</i>	Oxigenasa KshA	2932334..2933494	<i>kshA2</i>
<i>MSMEG_2871</i>	Proteína hipotética	2933491..2933769	
<i>MSMEG_2872</i>	Oxidorreductasa de la familia SDR	2933753..2934544	
<i>MSMEG_2873</i>	Proteína hipotética	2934557..2936146	
<i>MSMEG_2874</i>	Proteína hipotética	2936210..2937286, complementaria	
<i>MSMEG_2875</i>	Esterasa	2937393..2938373, complementaria	
<i>MSMEG_2876</i>	Oxidorreductasa de la familia SDR	2938382..2939260, complementaria	
<i>MSMEG_2877</i>	Proteína hipotética	2939257..2939754, complementaria	

Gen	Descripción génica	Localización genómica	Función putativa
<i>MSMEG_2878</i>	Acil-CoA deshidrogenasa	2939825..2940826, complementaria	
<i>MSMEG_2879</i>	Acil-CoA deshidrogenasa	2940823..2941974, complementaria	
<i>MSMEG_2880</i>	Enoil-CoA hidratasa	2941974..2942756, complementaria	
<i>MSMEG_2881</i>	Aldehído deshidrogenasa	2942785..2944206, complementaria	
<i>MSMEG_2882</i>	5-Exo-alcohol deshidrogenasa	2944225..2945340, complementaria	
<i>MSMEG_2883</i>	Acil-CoA sintetasa	2945429..2946994, complementaria	
<i>MSMEG_2884</i>	Ciclohexanona monooxigenasa	2947132..2949054	
<i>MSMEG_2885</i>	Oxidoreductasa de la familia SDR	2949051..2949938	
<i>MSMEG_2886</i>	Proteína de la familia de respuesta a estrés con dominio barril A/B	2949940..2950560, complementaria	
<i>MSMEG_2887</i>	Proteína hipotética	2950566..2950952, complementaria	
<i>MSMEG_2888</i>	Lipasa	2952197..2953147, complementaria	
<i>MSMEG_2889</i>	NADH:flavin oxidoreductasa	2951016..2952254	
<i>MSMEG_2890</i>	Regulador transcripcional	2953144..2954040, complementaria	<i>iclR</i>
<i>MSMEG_2891</i>	Bifenil-2,3-diol-1,2-dioxigenasa	2954224..2955126, complementaria	<i>hsaC2</i>
<i>MSMEG_2892</i>	Hidroxilasa de producción de pigmentos	2955143..2956324, complementaria	<i>hsaA2</i>
<i>MSMEG_2893</i>	Oxidoreductasa, NAD/FAD	2956384..2957439, complementaria	<i>kshB2</i>
<i>MSMEG_2894</i>	Esteroides monooxigenasa	2957572..2959194	<i>smo</i>
<i>MSMEG_2895</i>	Oxidoreductasa de la familia SDR	2959295..2960089	
<i>MSMEG_2896</i>	Proteína hipotética	2960097..2960960	
<i>MSMEG_2897</i>	Proteína hipotética	2961061..2961381	
<i>MSMEG_2898</i>	Regulador transcripcional de la familia TetR	2961476..2962030	<i>tetR</i>
<i>MSMEG_2899</i>	Oxidoreductasa de la familia SDR	2962139..2962834	
<i>MSMEG_2900</i>	2-Hidroxi-6-oxo-6-fenilhexa-2,4-dienoato hidrolasa	2963487..2964347, complementaria	<i>hsaD2</i>
<i>MSMEG_2901</i>	Proteína hipotética	2962927..2963490	

Tabla 14. Identificación *in silico* y anotación génica del *cluster* génico C-19+ en el genoma de *M. smegmatis* mc²155 (NC_008596.1). Esta región genómica de 50 kb contiene numerosos genes codificando enzimas posiblemente relacionadas con el metabolismo de esteroides y en particular, con la degradación de esteroides C-19 en las cepas C-19+.

1.1.4. Análisis de expresión génica del *cluster* C-19+

Antes de comenzar con los análisis transcripcionales, en este trabajo se aisló una colección de cepas C-19+ siguiendo el método de adaptación a esteroides C-19 previamente descrito (Fig. 9). Para ello, se realizaron experimentos independientes y se usaron distintos esteroides C-19 y diferentes cepas parentales (Tabla 7). En los próximos apartados se utilizará el término “cepa C-19+” para referirse a todas aquellas cepas que presentan un fenotipo C-19+, es decir, que son capaces de utilizar eficientemente esteroides C-19 como única fuente de carbono y energía en ausencia de una fase de adaptación larga. Por el contrario, se utilizará el término “cepa parental/silvestre” para referirse a las cepas micobacterianas a partir de las que se han obtenido las cepas C-19+ tras su adaptación en esteroides C-19 durante más de 120-150 h y que por tanto, no son capaces de crecer eficientemente en estos compuestos. Este término será utilizado con independencia del origen de la cepa o que ésta sea un mutante de otro tipo.

A continuación, para investigar si la degradación de esteroides C-19 en las cepas C-19+ está relacionada con la expresión de genes del *cluster* C-19+, se analizaron sus niveles de transcripción en varias cepas silvestres y cepas C-19+ por RT-PCR semi-cuantitativa. Para ello, se aisló ARN de las distintas cepas crecidas en medio mínimo con colesterol 1,8 mM, glicerol 18 mM o AD 1,8 mM como única fuente de carbono y energía. Para la obtención de biomasa en las cepas silvestres en los cultivos de AD, se añadió glicerol 18 mM como fuente de carbono. En estos experimentos se observó que los genes del *cluster* C-19+ analizados eran expresados constitutivamente en las cepas C-19+ con independencia de la fuente de carbono utilizada en el medio de cultivo (p. ej., glicerol, colesterol, AD) (Fig. 15). El hecho de que estos genes no se induzcan en presencia de esteroides C-19 (p. ej., AD) puede explicar por qué las cepas parentales son incapaces de crecer en estos compuestos.

Por otra parte, se comprobó que los genes del *cluster* C-19+ no son transcritos o presentan los mismos niveles de expresión basal en la cepa mutante *M. smegmatis* $\Delta kstR$ que en la cepa silvestre en todas las condiciones de cultivo ensayadas (incluso cuando el mutante $\Delta kstR$ está creciendo en AD o ADD). Esta observación vuelve a confirmar que los genes del *cluster* C-19+ no son miembros del regulón *kstR*, es decir, no se inducen por colesterol (p. ej., *MSMEG_2869* y *MSMEG_2870*) (Fig. 15A). Estos resultados también sugieren que la degradación de AD/ADD en la cepa $\Delta kstR$ se efectúa a través de la ruta catabólica del colesterol, lo cual podría explicar las diferencias fenotípicas observadas en el crecimiento respecto a las cepas C-19+. Estos datos coinciden con los experimentos con microarrays realizados previamente en *M. smegmatis* mc²155 (Uhía *et al.*, 2012) y en el mutante *M. smegmatis* $\Delta kstR$ (Kendall *et al.*, 2007), que mostraron que el *cluster* C-19+ no se encuentra sobreexpresado en presencia de colesterol o en condiciones de desrepresión, respectivamente.

Finalmente, se observó que la expresión de los genes *MSMEG_6000* y *MSMEG_6012*, dos miembros del regulón *kstR2* del catabolón del colesterol (Kendall *et al.*, 2010), está incrementada en las cepas C-19+ crecidas en esteroides C-19 (Fig. 16). Este resultado sugería que la ruta catabólica de esteroides C-19 converge con la ruta catabólica del colesterol a nivel del regulón *kstR2* a través de un intermediario que es capaz de unirse al represor KstR2 (Casabon *et al.*, 2013; García-Fernández *et al.*, 2015). Por otra parte, se observó una expresión basal del gen *MSMEG_5940* (*hsaE*), que es parte del operón *hsaEFG* (*MSMEG_5940_5939_5937*) involucrado en la degradación de ácido 2-hidroxi-2,4-hexadieno, en las cepas de *M. smegmatis* en presencia de glicerol y esteroides C-19 (Fig. 13). Por tanto, el catabolismo de esteroides C-19 en las células C-19+ podría también converger con la ruta catabólica del colesterol a través de este intermediario.

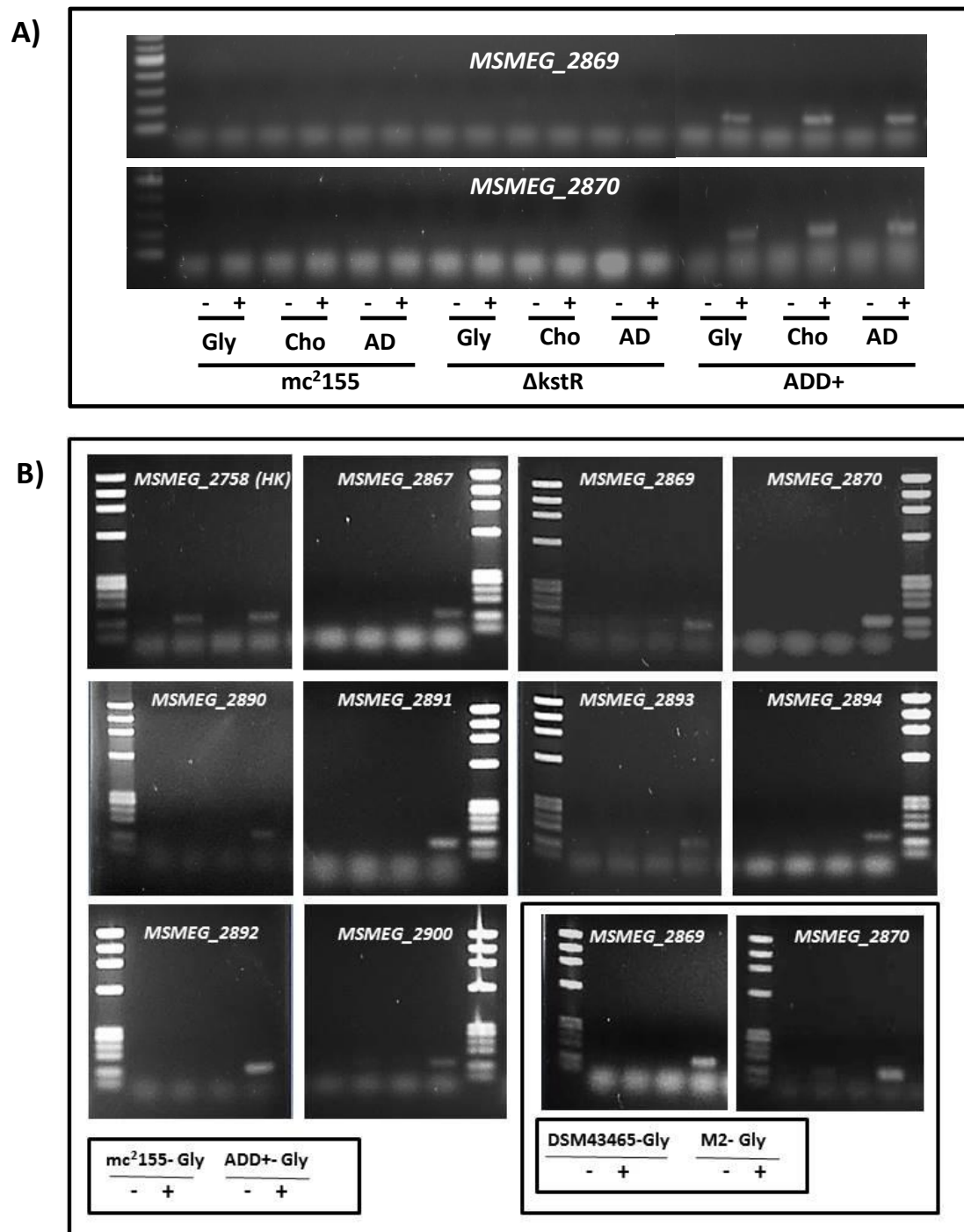


Figura 15. Electroforesis en geles de agarosa 1,5% de los productos de RT-PCR semicuantitativa obtenidos durante el análisis de la expresión génica del *cluster C-19+* en varias cepas de *M. smegmatis*. A) *M. smegmatis* mc²155, *M. smegmatis* ADD+ y *M. smegmatis* ΔkstR. B) *M. smegmatis* mc²155, *M. smegmatis* ADD+, *M. smegmatis* DSM 43465 y *M. smegmatis* M2. Las células utilizadas para la purificación de ARN total se cultivaron en medio mínimo con glicerol 18 mM (Gly), colesterol 1,8 mM (Cho) o AD 1,8 mM (AD) como únicas fuentes de carbono y energía. Para analizar la expresión génica en presencia de AD en la cepa *M. smegmatis* mc²155, se añadió glicerol 18 mM para promover el crecimiento. La extracción de ARN y las reacciones de RT-PCR se realizaron como se indican en el Apartado 5 de los Materiales y Métodos. Las secuencias de los oligonucleótidos empleados se muestran en la Tabla 9. Se utilizó Quick-Load® 100 bp DNA Ladder como marcador de masa molecular (NEB). Se realizaron controles sin transcriptasa reversa para verificar la ausencia de contaminación por ADN genómico (-). Abreviaturas: HK (housekeeping).

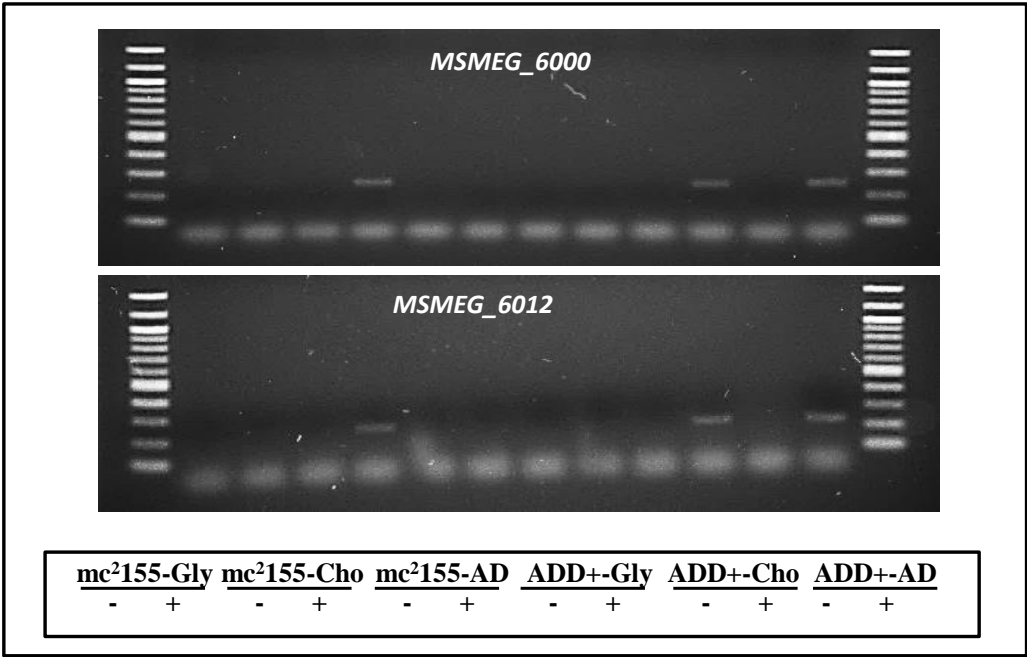


Figura 16. Electroforesis en geles de agarosa 1,5% de los productos de RT-PCR semicuantitativa obtenidos durante el análisis de la expresión génica del regulón *kstR2* en las cepas *M. smegmatis* mc²155 y ADD+. Las células utilizadas para la purificación de ARN total se cultivaron en medio mínimo con glicerol 18 mM (Gly), colesterol 1,8 mM (Cho) o AD 1,8 mM (AD) como únicas fuentes de carbono y energía. Para analizar la expresión génica en presencia de AD en la cepa *M. smegmatis* mc²155, se añadió glicerol 18 mM para promover el crecimiento. La extracción de ARN y las reacciones de RT-PCR se realizaron como se indican en el Apartado 5 de los Materiales y Métodos. Las secuencias de los oligonucleótidos empleados se muestran en la Tabla 9. Se utilizó Quick-Load® 100 bp DNA Ladder como marcador de masa molecular (NEB). Se realizaron controles sin transcriptasa reversa para verificar la ausencia de contaminación por ADN genómico (-). Abreviaturas: HK (housekeeping).

1.1.5. Identificación de mutaciones responsables del fenotipo C-19+

Los análisis de expresión génica revelaron que los genes del *cluster* C-19+ son sobreexpresados constitutivamente en las cepas C-19+, que indica que podrían presentar alguna modificación en una proteína o circuito regulatorio. Dentro del *cluster* C-19+, se han anotado tres genes (*MSMEG_2868*, *MSMEG_2890* y *MSMEG_2898*) que codifican reguladores transcripcionales de la familia PadR, IclR y TetR, respectivamente. Con el objetivo de identificar en estos reguladores posibles mutaciones, los tres genes (y sus regiones promotoras y terminadoras) se amplificaron por PCR y se secuenciaron en una cepa C-19+ (ADD+) y en la cepa silvestre correspondiente (mc²155) (Fig. 17).

Siguiendo la aproximación experimental antes descrita, se identificó una delección de 9 pb en el gen *padR* (*MSMEG_2868*) de la cepa ADD+ (Tabla 15), mientras que no se encontró ninguna mutación en sus genes *iclR* y *tetR*. La mutación identificada provocaba la pérdida de tres aminoácidos en la proteína PadR, que podría ser responsable del fenotipo C-19+. Para apoyar esta hipótesis, se decidió extender los análisis de secuenciación del gen *padR* a otras cepas C-19+ previamente aisladas (Tabla 15). Por ejemplo, se identificó otra delección de 9 pb en el gen *padR* de la cepa mutante M1 que provocaba la pérdida de 3 aminoácidos en el dominio proteico de unión al DNA (Tabla 15).

En la cepa M2, derivada de la cepa de referencia *M. smegmatis* DSM 43465, no se pudo amplificar el gen *padR* por PCR con los cebadores *MSMEG_2868seqF* y *MSMEG_2868seqR* usados previamente. Sin embargo, utilizando los cebadores más externos *MSMEG_2858qF* y

*MSMEG_2870*seqR que hibridan en los genes *MSMEG_2858* y *MSMEG_2870*, respectivamente, se logró amplificar un fragmento de ADN de 3,8 kb. Tras secuenciar este producto de PCR, se identificó una delección de 8,3 kb que se extiende desde el gen *MSMEG_2858* hasta el gen *MSMEG_2868* e incluye gran parte del gen *padR* (Tabla 15). Teniendo en cuenta que la cepa M2 es capaz de degradar esteroides C-19 como el resto de mutantes, se puede inferir que los genes delecionados no son esenciales para la degradación de estos compuestos. Esto significa que el gen *MSMEG_2867* que codifica una 3-cetoesteroide Δ^1 -deshidrogenasa (KstD3) puede no ser esencial para la degradación de esteroides C-19. Por el contrario, el hecho que el gen *MSMEG_2869* codificando la KstD2 se mantenga justo al borde de la delección, puede sugerir que esta enzima juega un papel clave en el catabolismo de estos compuestos.

La cepa M3, que fue obtenida a partir del mutante *M. smegmatis* MS6039-5941($\Delta kshB1$, $\Delta kstD1$) (Galán *et al.*, 2017), presentaba una mutación puntual en el gen *padR* que provocaba un cambio de aminoácido en la proteína (A114W) (Tabla 15). En los mutantes M4 y M5 se identificaron inserciones de 15 pb y 45 pb dentro del gen *padR*, respectivamente (Tabla 15). Curiosamente, las inserciones provocaban duplicaciones de 3 aminoácidos (aa 131-133) en la cepa M4 y de 15 aminoácidos (aa 165-179) en la cepa M5.

Todos estos resultados sugerían que la modificación/inactivación del regulador PadR podría ser responsable del fenotipo C-19+, causando directa o indirectamente la expresión constitutiva de los genes del *cluster* C-19+ en las cepas mutantes C-19+. Aunque estos resultados no excluyen la posibilidad de que los genes *iclR* y/o *tetR* también puedan desempeñar un papel en el fenotipo C-19+, nuestros experimentos siguientes se centraron en demostrar la función biológica del gen *padR* y la existencia de una nueva ruta catabólica para la degradación de esteroides C-19 en *M. smegmatis*.

Cepa C-19+	Genotipo/Fenotipo	Modificación ADN genómico (mutación)	Modificación proteica
ADD+	Derivada de <i>M. smegmatis</i> mc ² 155 después de cultivar en MM con ADD	405_413del	Y136_D138del
M1	Derivada de <i>M. smegmatis</i> mc ² 155 después de cultivar en MM con ADD	186_194del	L63_R65del
M2	Derivada de <i>M. smegmatis</i> DSM 43465 después de cultivar en MM con AD	1_330del*	Sin dominio NH ₂ terminal
M3	Derivada de <i>M. smegmatis</i> M6039-5941 después de cultivar en MM con AD	340C>T	R114W
M4	Derivada de <i>M. smegmatis</i> mc ² 155 después de cultivar en MM con 9OH-AD	391_399dup	A131_H133dup
M5	Derivada de <i>M. smegmatis</i> DSM 43465 después de cultivar en MM con 9OH-AD	493_537dup	R165_L179dup

Tabla 15. Mutaciones en el gen *padR* (*MSMEG_2868*) encontradas en las cepas C-19+ de *M. smegmatis* aisladas. La nomenclatura utilizada para la descripción de las mutaciones fue descrita por den Dunnen y Antonarakis (2000). Abreviaturas: MM (medio mínimo). *Gran delección genómica (g.2921804_2930141; NC_008596.1) que incluye los genes desde *MSMEG_2858* hasta *MSMEG_2868*.

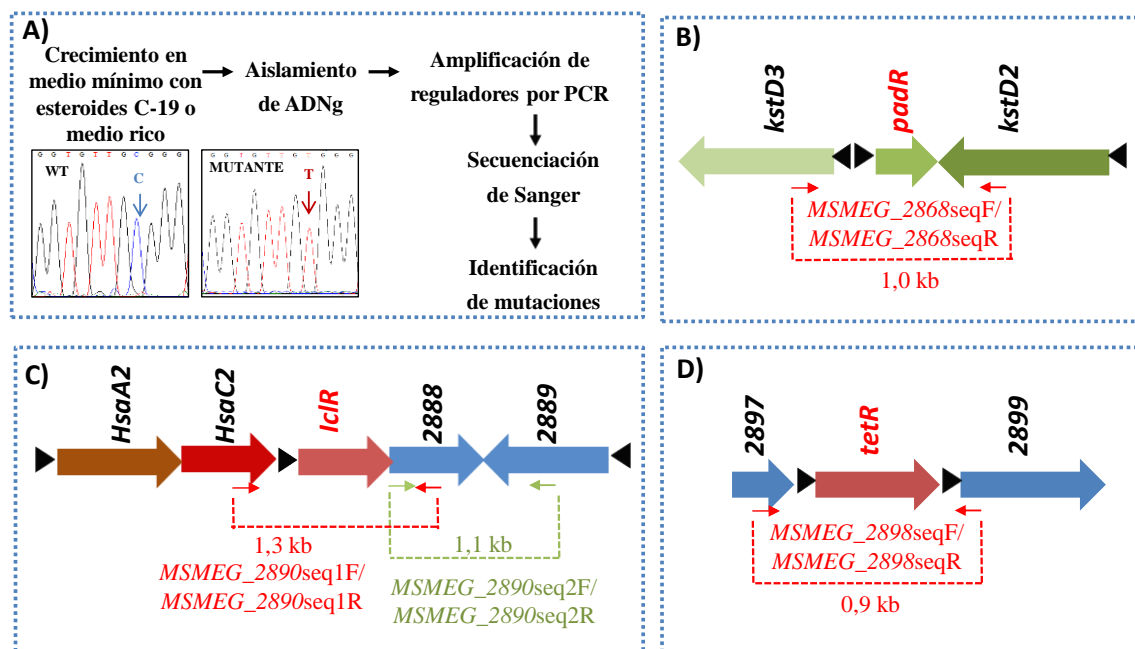


Figura 17. Representación esquemática de la aproximación seguida para la secuenciación de los reguladores transcripcionales del cluster C-19+ en *M. smegmatis*. A) Etapas básicas necesarias para la identificación de mutaciones en los reguladores transcripcionales del cluster. B) Amplificación por PCR del gen *padR* (MSMEG_2868). C) Amplificación por PCR del operón que incluye el gen *iclR* (MSMEG_2890). D) Amplificación por PCR del gen *tetR* (MSMEG_2898). Los genes y los promotores anotados se representan con flechas y triángulos negros, respectivamente. Nomenclatura de la anotación génica (NC_008596.1): MSMEG_(número).

1.1.6. Construcción de un mutante $\Delta padR$

Para confirmar que las mutaciones localizadas en el regulador *padR* son responsables de la adquisición del fenotipo C-19+ en las cepas C-19+, se construyó una cepa mutante de delección mediante doble recombinación homóloga en *M. smegmatis* mc²155 denominada MS2868 (mutante $\Delta padR$).

Al igual que se observó en las cepas C-19+ (Fig. 10C), la cepa mutante MS2868 fue capaz de crecer en medio mínimo con AD, ADD o 9OH-AD como única fuente de carbono y energía (Fig. 18A). Para confirmar que la delección de *padR* es la única mutación responsable del fenotipo C-19+ observado en MS2868, el mutante se complementó *en trans* con una copia original del gen *padR*. Para ello, este gen fue clonado en el plásmido pMV261 generando el plásmido pMVPadR y utilizado para transformar MS2868. La cepa recombinante *M. smegmatis* MS2868 (pMVPadR) fue incapaz de crecer en esteroides C-19 (p. ej., AD) en 90 h de cultivo (Fig. 18B), pero crecía de manera normal en otras fuentes de carbono como glicerol (datos no mostrados).

Por otra parte, para confirmar que el mutante MS2868 expresa constitutivamente el cluster C-19+ y que la expresión de *padR* *en trans* reprime la expresión del mismo, se analizó su expresión génica por RT-PCR semicuantitativa en las cepas *M. smegmatis* MS2868 y *M. smegmatis* MS2868 (pMVPadR). Además, se utilizaron las cepas *M. smegmatis* mc²155 y *M. smegmatis* ADD+ como controles negativo y positivo de expresión génica, respectivamente. Para ello, se aisló ARN de las cuatro cepas crecidas en medio mínimo con glicerol 18 mM como única fuente de carbono y energía (Fig.19). Estos resultados demostraron que la expresión del gen *padR* restaura el fenotipo silvestre, es decir, reprime la expresión de genes del cluster C-19+ y provoca la pérdida de la capacidad de metabolizar esteroides C-19.

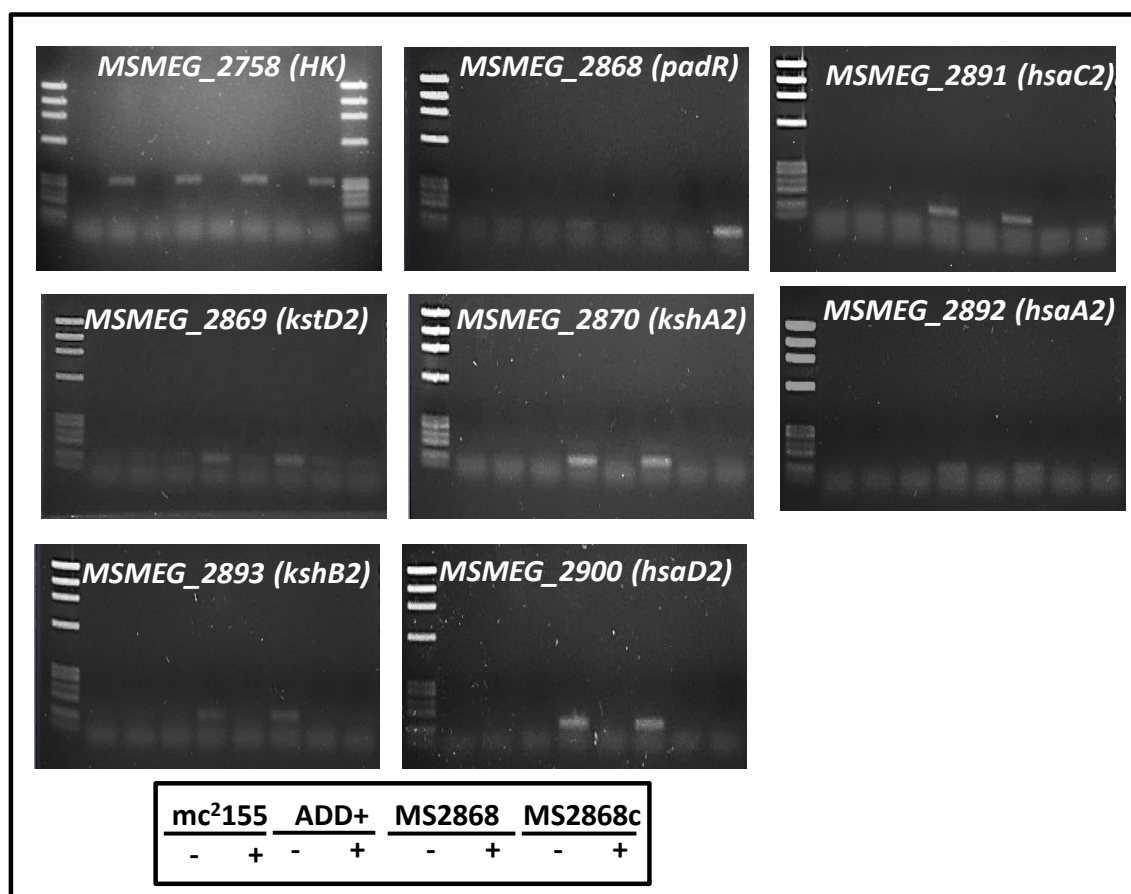
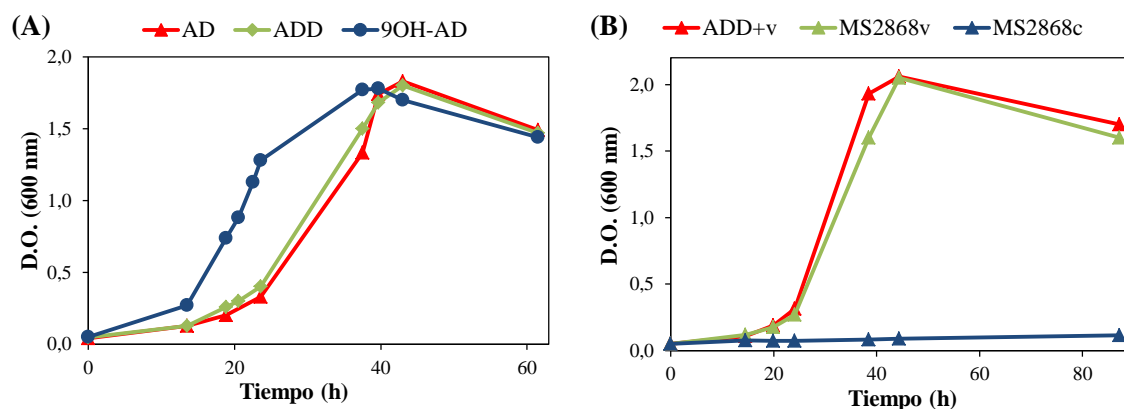


Figura 19. Electroforesis en geles de agarosa 1,5% de los productos de RT-PCR semicuantitativa obtenidos durante el análisis de la expresión génica del cluster C-19+ en distintas cepas de *M. smegmatis*: mc²155, ADD+, MS2868 y la cepa MS2868 complementada (MS2868c). Las células utilizadas para la purificación de ARN total se cultivaron en medio mínimo con glicerol 18 mM como única fuente de carbono y energía. La extracción de ARN y las reacciones de RT-PCR se realizaron como se indican en el Apartado 5 de los Materiales y Métodos. Las secuencias de los oligonucleótidos empleados se muestran en la Tabla 9. Se utilizó DNA del fago Φ X-174 digerido con la enzima de restricción *Hae*III como indicador de masa molecular. Se realizaron controles sin transcriptasa reversa para verificar la

ausencia de contaminación por ADN genómico (-). Abreviaturas: HK (housekeeping).

1.1.7. Origen de los mutantes C-19+ en la población microbiana

La aparición de mutantes en las poblaciones bacterianas ha sido objeto de estudio por su importancia en fenómenos como la adquisición de mecanismos de resistencia a antibióticos (p.ej., Martínez y Baquero, 2000). Cuando una población bacteriana es expuesta a condiciones selectivas (p.ej., presencia de un antibiótico o cultivos en medios mínimos con fuentes de carbono únicas), se observa un fenómeno de “desplazamiento” por parte de aquellas bacterias de la población (mutantes) que son capaces de sobrevivir y/o dividirse en dichas condiciones. Existen fundamentalmente dos teorías que explican la aparición de estos mutantes: la primera teoría defiende que estos mutantes están presentes en la población inicial y la segunda defiende que los mutantes aparecen como consecuencia de la exposición a condiciones selectivas de estrés (p.ej., Anderson y Purdom, 2009; Jayaraman, 2011).

Con el objetivo de discernir cuál de estas dos teorías puede explicar el origen de las cepas C-19+ aquí descritas, se planteó el experimento que a continuación se describe (Fig. 20). Se preparó un preinóculo de *M. smegmatis* mc²155 en medio rico (7H9, en ausencia de esteroides) y se utilizó para inocular tres cultivos independientes de medio mínimo con esteroide C-19 (AD, ADD o 9OH-AD) como única fuente de carbono y energía. Al cabo de 120-150 h, se observó el crecimiento bacteriano descrito previamente como fenotipo C-19+ (ver Fig. 10B). Para obtener colonias individuales, se plaqueó un pequeño volumen de cultivo en medio sólido 7H10. Se aislaron cuatro colonias de cada condición, se extrajo ADN genómico y se amplificó por PCR y secuenció el gen *padR*. A diferencia de los experimentos previos que fueron totalmente independientes, en este caso, se aislaron cepas C-19+ obtenidas a partir de un preinóculo común inicial.

En este experimento se identificaron dos tipos de mutaciones en el gen *padR* en las colonias analizadas. Las cuatro colonias aisladas del cultivo en ADD y tres colonias del cultivo en AD, presentaban una delección de 81 pb en la zona promotora del gen *padR*, (mutación 1) (delección g.2929761_2929841; NC_008596.1). Por otra parte, las cuatro colonias aisladas del cultivo en 9OH-AD y una colonia procedente del cultivo en AD, presentaban una inserción de una transposasa en el gen *padR* (mutación 2) (inserción g.2929898_2930179; NC_008596.1). La identificación del mismo tipo de mutantes en los tres cultivos independientes sugiere que los mutantes estaban presentes en la población original (preinóculo) y fueron seleccionados *a posteriori*. Por tanto, estos resultados apoyan la hipótesis de que las células mutantes que expresan el *cluster* C-19+ pueden estar presentes en la población inicial y sólo cuando se cultivan en condiciones de presión selectiva (una única fuente de carbono) son capaces de desplazar al resto de la población, ya que son las únicas capaces de crecer y dividirse en dichas condiciones. Dado que los mutantes parecen estar presentes en una pequeña proporción del inóculo, sólo se puede observar crecimiento bacteriano en el cultivo (aumento en la D.O.₆₀₀) cuando un determinado número de horas ha transcurrido (> 150 h) en estas condiciones de ensayo.

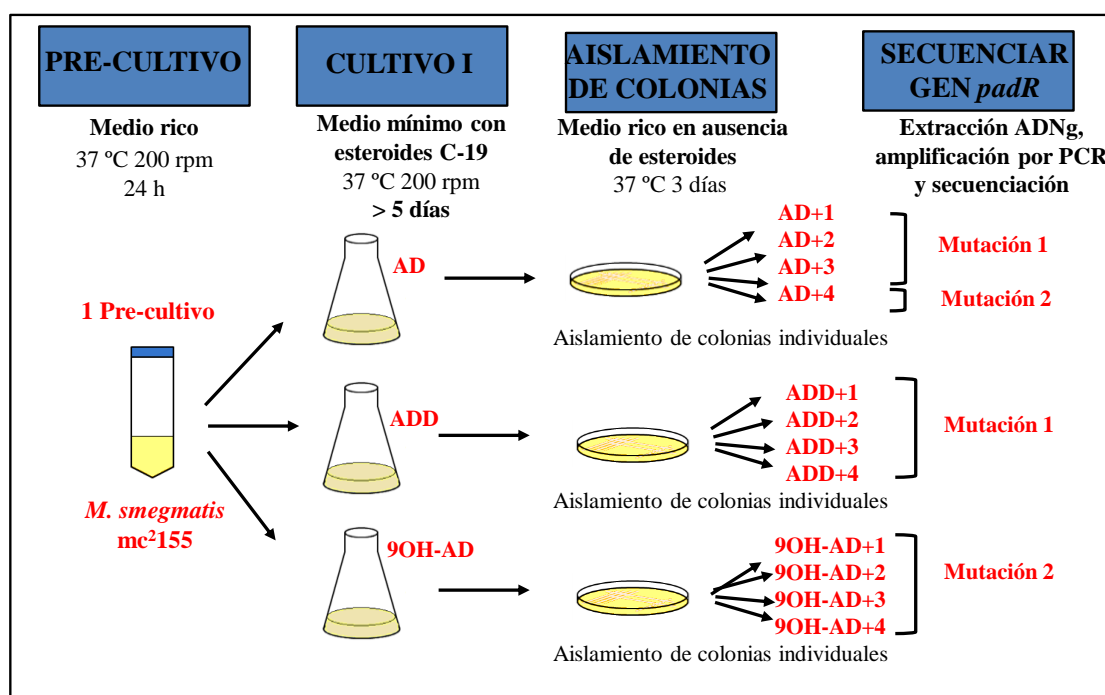


Figura 20. Representación esquemática de la aproximación seguida para identificar el origen de las cepas C-19+ en la población bacteriana. Se aislaron 16 colonias de *M. smegmatis* con fenotipo C-19+ obtenidas en tres experimentos de adaptación a esteroides C-19 independientes. En el ensayo se utilizó el mismo pre-cultivo en medio rico. Tras amplificar por PCR y secuenciar el gen *padR* (*MSMEG_2868*), se identificaron dos únicas mutaciones en el genoma (NC_008596.1) de las cepas analizadas: mutación 1 (deleción g.2929761_2929841) y mutación 2 (inserción g.2929898_2930179).

1.8. Determinación de la función biológica de los genes del *cluster* C-19+ en *M. smegmatis*

1.1.8.1. Determinación de la función biológica de los genes *MSMEG_2867*, *MSMEG_2869*, *MSMEG_2870* y *MSMEG_2893*. Ensayos de funcionalidad por complementación y *resting-cell*

En los análisis *in silico* previos del *cluster* C-19+ (Tabla 13), se identificaron varios genes que podrían codificar enzimas con actividad 9 α -hidroxilasa y Δ^1 -deshidrogenasa. El gen *MSMEG_2893* podría codificar el componente reductasa de una 3-cetosteroide-9 α -hidroxilasa que presenta un 55% de identidad proteica a KshB1 (*MSMEG_6039*), mientras que el gen *MSMEG_2870* podría codificar el componente oxigenasa de la misma enzima ya que presenta un 59% de identidad proteica a KshA1 (*MSMEG_5925*). Los genes *MSMEG_2867* y *MSMEG_2869* probablemente codifican 3-cetosteroide- Δ^1 -deshidrogenasas con una identidad proteica del 36% y 44% a KstD1 (*MSMEG_5941*), respectivamente.

Para verificar que estos genes presentan la actividad biológica propuesta, se procedió a la complementación *in trans* de los mutantes de deleción génica MS5941 (Δ *MSMEG_5941*, Δ *kstD1*) y MS6039 (Δ *MSMEG_6039*, Δ *kshB1*) (Tabla 7). A diferencia de la cepa parental *M. smegmatis* mc²155, estos mutantes no son capaces de crecer eficientemente en esteroides cuando son utilizados como única fuente de carbono y energía debido a una deficiencia de actividad enzimática 3-cetosteroide- Δ^1 -deshidrogenasa y 3-cetosteroide-9 α -hidroxilasa, respectivamente (Ir a Apartado 2.1. y a Galán *et al.*,

2017, para una descripción más detallada). Por tanto, la sobreexpresión de genes *kstD* o *kshB* debería restaurar la capacidad de las cepas MS5941 y MS6039 de crecer en esteroides. Para este propósito, se clonaron los genes *MSMEG_2867*, *MSMEG_2869* y *MSMEG_2893* en el plásmido pMV261 y se obtuvieron los plásmidos recombinantes correspondientes pMV2867, pMV2869 y pMV2893. Adicionalmente, se clonaron los genes *MSMEG_5941* y *MSMEG_6039* en el mismo plásmido y se obtuvieron los plásmidos recombinantes pMV5941 y pMV6039, que fueron usados como controles de complementación en las distintas cepas.

En la Fig. 21A, se muestran las curvas de crecimiento de la cepa MS5941 complementada en *trans* con diversos genes *kstD*. La sobreexpresión del gen *kstD2* (*MSMEG_2869*) restauró la capacidad de la cepa MS5941 de crecer en medio mínimo con colesterol como única fuente de carbono, presentando un crecimiento similar a la cepa parental mc²155 y a la cepa mutante complementada en *trans* con el gen *kstD1* (*MSMEG_5941*) que presenta delecionado. Por el contrario, la sobreexpresión del gen *kstD3* (*MSMEG_2867*) en *trans* no complementó la mutación, lo que indica que KstD3 presenta otra actividad enzimática o una especificidad de sustrato diferente a la proteína KstD1. En la Fig. 21B, se representan las curvas de crecimiento de la cepa MS6039 complementada en *trans* con genes *kshB*. La sobreexpresión del gen *kshB2* (*MSMEG_2893*) restauró la capacidad de la cepa MS6039 de crecer en medio mínimo con colesterol como única fuente de carbono. El crecimiento de esta cepa recombinante fue similar al observado en la cepa parental mc²155 y en la cepa mutante MS6039 complementada en *trans* con el gen *kshB1* (*MSMEG_6039*). Estos resultados demostraron que las enzimas KstD2 y KshB2 presentan actividad enzimática 3-cetoesteroide- Δ^1 -deshidrogenasa y reductasa, respectivamente.

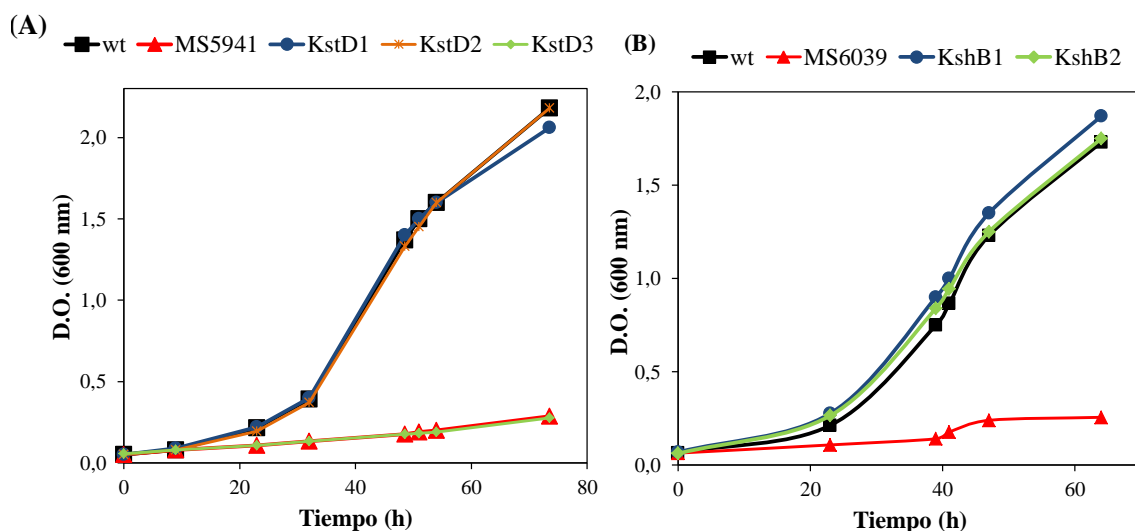


Figura 21. Ensayos de complementación en *trans* de los mutantes MS5941 y MS6039. Curvas de crecimiento de diversas cepas de *M. smegmatis* cultivadas en medio mínimo 7H9 con colesterol 1,8 mM como única fuente de carbono y energía. **(A)** Complementación de la cepa MS5941. Cepas utilizadas: mc²155 pMV261 [wt, negro], MS5941 (pMV261) [MS5941, rojo], MS5941 (pMV5941) [KstD1, azul], MS5941 (pMV2869) [KstD2, naranja] y MS5941 (pMV2867) [KstD3, verde]. **(B)** Complementación de la cepa MS6039. Cepas utilizadas: mc²155 pMV261 [wt, negro], MS6039 (pMV261) [MS6039, rojo], MS6039 (pMV6039) [KshB1, azul] y MS6039 (pMV2893) [KshB2, verde].

Con el objetivo de investigar si la proteína KstD3 presenta actividad enzimática 3-cetoesteroide- Δ^1 -deshidrogenasa, se llevaron a cabo biotransformaciones en *resting-cell* de acuerdo al procedimiento descrito en los Materiales y Métodos (Apartado 9.3.). Cuando se utilizó como sustrato de la biotransformación AD 1,8 mM, la cepa MS5941 (pMV2867) que sobreexpresa el gen *kstD3* fue capaz de

transformar el AD en ADD. Por el contrario, no se observó modificación alguna por parte de la cepa control MS5941 (pMV261) (Fig. 22). Siguiendo la misma aproximación, se demostró que el gen *MSMEG_2870* (*kshA2*) codifica una enzima 3-cetosteroide-9 α -hidroxilasa funcional que es capaz de transformar el AD en 9OH-AD (Fig. 22). La actividad enzimática de las distintas proteínas KstD y KshA fueron estudiadas en mayor profundidad en el Apartado 2.3. de esta Tesis Doctoral.

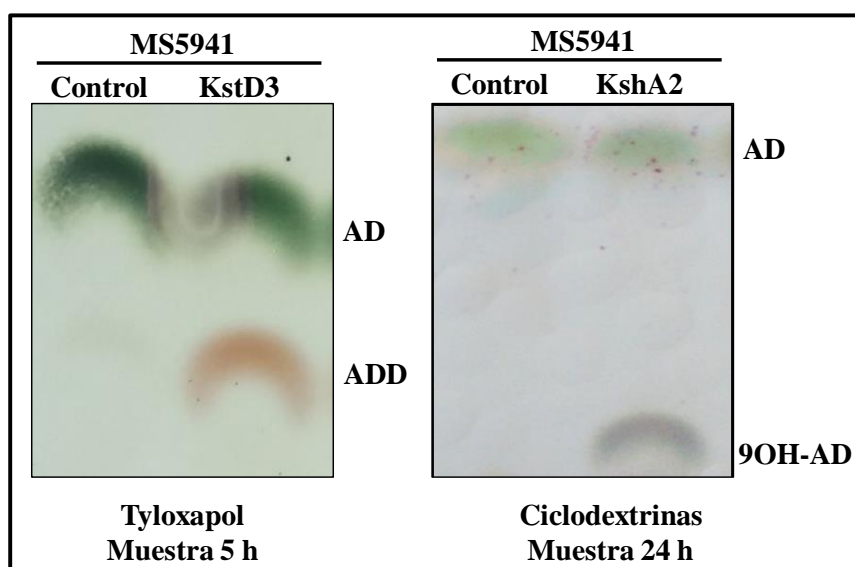


Figura 22. Ensayos de funcionalidad biológica mediante biotransformaciones en *resting-cell*. Análisis mediante cromatografía en capa fina (TLC) de la biotransformación del sustrato AD por las cepas recombinantes de *M. smegmatis*: MS5941 (pMV261) [Control], MS5941 (pMV2867) [KstD3] y MS5941 (pMV2870) [KshA2].

1.1.8.2. Construcción de los mutantes MS2891, MS2892 y MS2900

En los análisis *in silico* previos del *cluster* C-19+ (Tabla 13), se identificaron genes homólogos de los genes que codifican las enzimas responsables de la modificación de los anillos A/B del núcleo esteroideo en el catabolismo del esteroides. El gen *MSMEG_2891* codifica posiblemente una 3,4-HSA dioxigenasa que presenta un 50% de identidad proteica a HsaC1 (*MSMEG_6036*). El gen *MSMEG_2892* puede codificar una 3-HSA monooxigenasa (componente oxigenasa) que presenta un 40% de identidad proteica a HsaA1 (*MSMEG_6038*). El gen *MSMEG_2900* probablemente codifica una 4-9-DSHA hidrolasa con un 41% de identidad proteica a HsaD1 (*MSMEG_6037*). Con el objetivo de investigar la esencialidad y/o la función biológica de estos genes en el catabolismo de esteroides C-19, se desarrollaron tres mutantes simples de delección génica en la cepa *M. smegmatis* ADD+ generando las cepas MS2891 (Δ *hsaC2*, Δ *MSMEG_2891*), MS2892 (Δ *hsaA2*, Δ *MSMEG_2892*) y MS2900 (Δ *hsaD2*, Δ *MSMEG_2900*). En la Figura 23, se representa un esquema resumen de las tres etapas enzimáticas postuladas que serán estudiadas en este apartado:

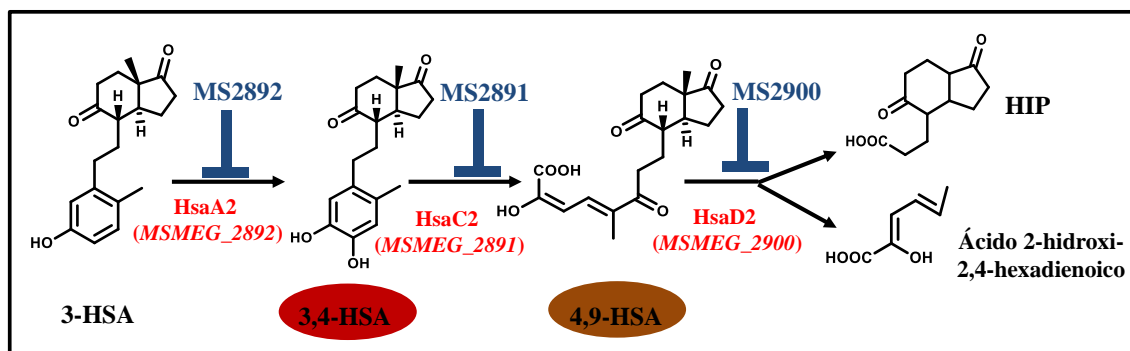


Figura 23. Representación esquemática de tres etapas enzimáticas postuladas en la modificación de los anillos A/B de esteroides C-19. Abreviaturas de las cepas mutantes: MS2891 ($\Delta hsaC2$, $\Delta MSMEG_2891$), MS2892 ($\Delta hsaA2$, $\Delta MSMEG_2892$) y MS2900 ($\Delta hsaD2$, $\Delta MSMEG_2900$). Abreviaturas de las enzimas: 3-HSA monooxigenasa (subunidad oxigenasa) (HsaA), 3,4-HSA dioxigenasa (HsaC) y 4,9-DSHA hidroxilasa (HsaD). Abreviaturas de los metabolitos: 3-hidroxi-9,10-secoandrosta-1,3,5(10)-trien-9,17-diona (3-HSA), 3,4-dihidroxi-9,10-secoandrosten-1,3,5(10)-trien-9,17-diona (3,4-HSA) (color rosado), ácido 4,5,9,10-diseco-3-hidroxi-5,9,7-trioxoandrosta-1(10),2-diene-4-oico (4,9-HSA) (color marrón) y 3α-H-4α(3'-ácido propiónico)-7αβ-metilhexahidro-1,5-indanediona (HIP).

Las cepas *M. smegmatis* MS2891, MS2892 y MS2900 no fueron capaces de crecer eficientemente en medio mínimo con esteroides C-19 como única fuente de carbono y energía (p. ej., AD 1,8 mM) (Fig. 24A), a diferencia de su cepa parental (cepa ADD+). En alguno de los cultivos en presencia de AD de los mutantes se observó un cambio en la coloración a causa de la acumulación de intermediarios esteroideos (Fig. 24B). El mutante MS2891 ($\Delta hsaC2$) desarrolló una coloración rosa en el medio, que indicaba la acumulación de catecoles (p.ej., 3,4-HSA) y su oxidación no-enzimática a derivados quinónicos que confieren ese color característico. Este fenotipo fue previamente observado en mutantes $\Delta hsaC$ del catabolismo del colesterol en *R. jostii* RHA1, *M. tuberculosis* H37Rv y *M. smegmatis* mc²155 (van der Geize *et al.*, 2007; Yam *et al.*, 2009; Uhía, 2010), así como en el mutante $\Delta tesB$ del catabolismo de esteroides en *C. testosteroni* TA441 cuando era incubado en presencia de ADD o ácido cólico (Horinouchiet *al.*, 2004). Por otra parte, el mutante MS2900 ($\Delta hsaD2$) desarrolló una coloración amarillenta-marrón en el medio debido posiblemente a la acumulación de 4,9-HSA (Gibson *et al.*, 1966). Esta coloración también fue observada en el mutante $\Delta tesD$ de *C. testosteroni* TA441 en presencia de testosterona (Horinouchi *et al.*, 2003). Las tres cepas mutantes presentaban un crecimiento normal en otras fuentes de carbono no esteroideas (p. ej., glicerol) (datos no mostrados).

A continuación, para confirmar la ausencia de efectos polares en los mutantes de delección génica, las tres cepas se complementaron en *trans* con una copia original del gen correspondiente delecionado (*MSMEG_2891*, *MSMEG_2892* o *MSMEG_2900*). Para ello, los tres genes se clonaron en el plásmido pMV261 generando los plásmidos recombinantes pMV2891, pMV2892 y pMV2900 y, se transformó con ellos las cepas mutantes MS2891, MS2892 y MS2900, respectivamente. Los mutantes MS2891 y MS2900 complementados (MS2891c y MS2900c, respectivamente) recuperaron la capacidad de crecer en medio mínimo con esteroides C-19 como única fuente de carbono y energía (p. ej., AD) (Fig. 25B). La cepa MS2892 complementada (MS2892c) no fue capaz de crecer en AD como única fuente de carbono y energía, aunque presentaba un crecimiento normal en otros sustratos (p.ej., glicerol) (Fig. 25A). Sin embargo, en presencia de AD, el medio de cultivo de la cepa complementada MS2892c desarrollaba la misma coloración rosa anteriormente observada en el mutante MS2891 (Fig. 25C). Este resultado confirmaba que el gen *MSMEG_2892* codifica una 3-HSA monooxigenasa que en condiciones de sobreexpresión puede provocar la acumulación del compuesto catecólico 3,4-HSA. Este tipo de

compuestos presentan una gran toxicidad para las células (Yam *et al.*, 2009).

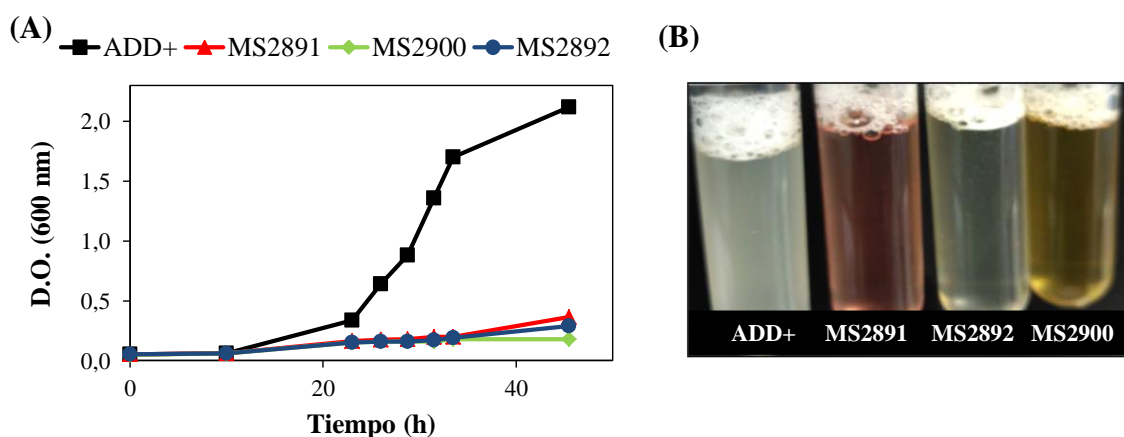


Figura 24. Curvas de crecimiento de cepas mutantes de *M. smegmatis* ADD+ en esteroides C-19. (A) Las cepas ADD+ (negro), MS2891 (rojo), MS2892 (azul) y MS2900 (verde) se cultivaron en medio mínimo 7H9 con AD 1,8 mM como única fuente de carbono y energía. (B) Fotografía tomada de una muestra final de los cultivos en presencia de AD.

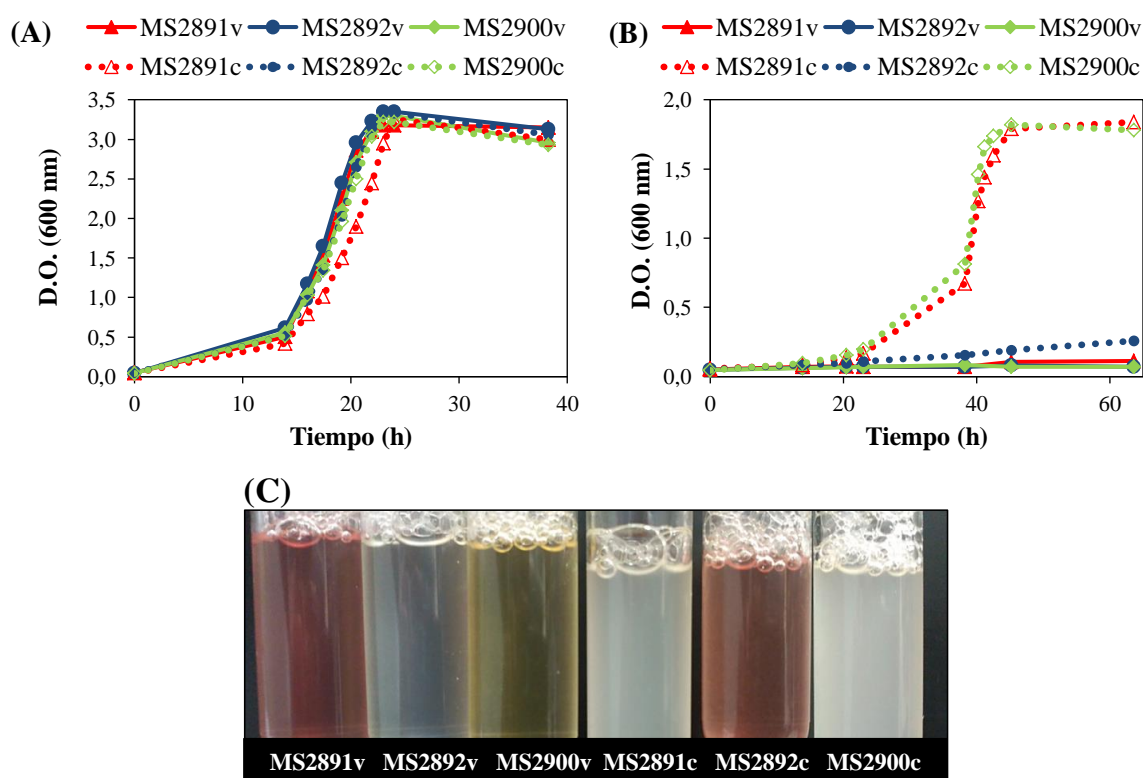


Figura 25. Ensayos de complementación de los mutantes MS2891, MS2892 y MS2900. Curvas de crecimiento de las cepas MS2891 (rojo), MS2892 (azul) y MS2900 (rojo) en medio mínimo 7H9 con glicerol 18 mM (A) o AD 1,8 mM (B) como única fuente de carbono y energía. Los mutantes fueron complementados *in trans* con una copia original del gen deletado (cepas MS2891c, MS2892c y MS2900c) o transformados con el plásmido vacío como control (cepas MS2891v, MS2892v y MS2900v). (C) Fotografía tomada de una muestra final de los cultivos en presencia de AD.

1.1.9. Ruta C-19+ para el catabolismo de esteroides C-19

A la vista de los resultados obtenidos, en este trabajo se propone la existencia de una ruta para la degradación de esteroides C-19 (AD, ADD y 9OH-AD) en *M. smegmatis* mc²155 denominada ruta C-19+ (Fig. 28). Esta ruta catabólica consta de una parte alta regulada transcripcionalmente por el represor PadR (“regulón C-19+” o “regulón *padR*”) y una ruta baja para la degradación de los anillos esteroideos C y D regulada por el represor KstR2 (regulón *kstR2*). Las enzimas HsaA2, HsaC2 y HsaD2, codificadas por los genes *MSMEG_2892*, *MSMEG_2891* y *MSMEG_2900*, son esenciales para la degradación de esteroides C-19 en *M. smegmatis*. Los genes *MSMEG_2870* y *MSMEG_2893* codifican los componentes hidroxilasa (KshA2) y reductasa (KshB2), respectivamente, de una enzima KSH2 alternativa funcional, mientras que los genes *MSMEG_2869* y *MSMEG_2867* codifican las proteínas 3-cetoesteroide- Δ^1 -deshidrogenasas KstD2 y KstD3, respectivamente. La organización de estos genes involucrados en la modificación de los anillos A/B de esteroides C-19 en *M. smegmatis*, así como de los genes ortólogos del catabolismo del colesterol, se muestra en la Figura 26. Como se puede observar existen diferencias significativas en la organización génica de ambos *clusters*.

En este punto, resulta conveniente introducir que la convergencia de rutas catabólicas de esteroides a nivel del regulón *kstR2* ya ha sido descrita en diversas actinobacterias (p.ej., Mohn *et al.*, 2012). De la misma manera, los genes *hsaE*, *hsaF* y *hsaG* parecen no siempre estar presentes en todos los *clusters* génicos de catabolismo de esteroides (Bergstrand *et al.*, 2016). Estos genes codifican una serie de enzimas que son comunes en muchas rutas catabólicas de compuestos aromáticos, de manera que en muchas especies bacterianas estos genes se disponen en distintas localizaciones del genoma. También resulta importante señalar que estos resultados no excluyen la posibilidad de que los genes *iclR* y/o *tetR* puedan desempeñar un papel regulatorio en el catabolismo de esteroides C-19 en *M. smegmatis*.

Por otra parte, se debe comentar que se observó un crecimiento diferencial de las cepas C-19+ (p.ej., ADD+ y MS2868) en colesterol respecto a la cepa silvestre mc²155 (Fig. 27D). La expresión constitutiva del *cluster* C-19+ en estas cepas podría de alguna manera interferir en la mineralización de colesterol. Este efecto se hizo aún más notable en las dos cepas mutantes de delección ADD+ Δ *hsaA2* (MS2892) y ADD+ Δ *hsaC2* (MS2891). De hecho, en esta última cepa, se observó la aparición de una coloración rosácea en el medio de cultivo asociada posiblemente a la acumulación de intermediarios catecólicos. También se observó que diversas cepas C-19+ (cepas I, II, III y IV), obtenidas en experimentos independientes a partir de la cepa parental MS6039-5941 (Δ *kshB1* Δ *kstD1*), presentaban un crecimiento diferencial en esteroides C-19 respecto a otras cepas C-19+ aisladas (p.ej., ADD+) (Fig. 27A, B, C). La existencia de niveles basales de KshB1 y/o KstD1 podrían favorecer la mineralización de esteroides C-19 en las cepas C-19+.

Todos estos aspectos serán considerados en los siguientes apartados en los que tratará de identificar la presencia de rutas catabólicas C-19+ y/o *clusters* C-19+ en otras especies bacterianas.

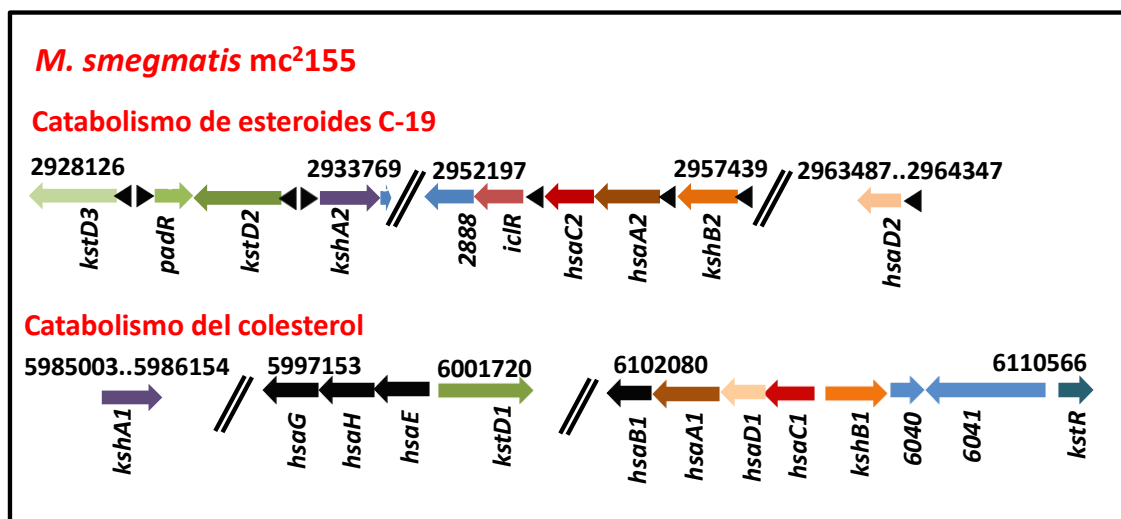


Figura 26. Representación esquemática de los genes involucrados en la modificación de los anillos A/B en el catabolismo de esteroides y esteroides C-19 en *M. smegmatis* mc²155 (NC_008596.1). Nomenclatura de la anotación génica: MSMEG_(número), *M. smegmatis*.

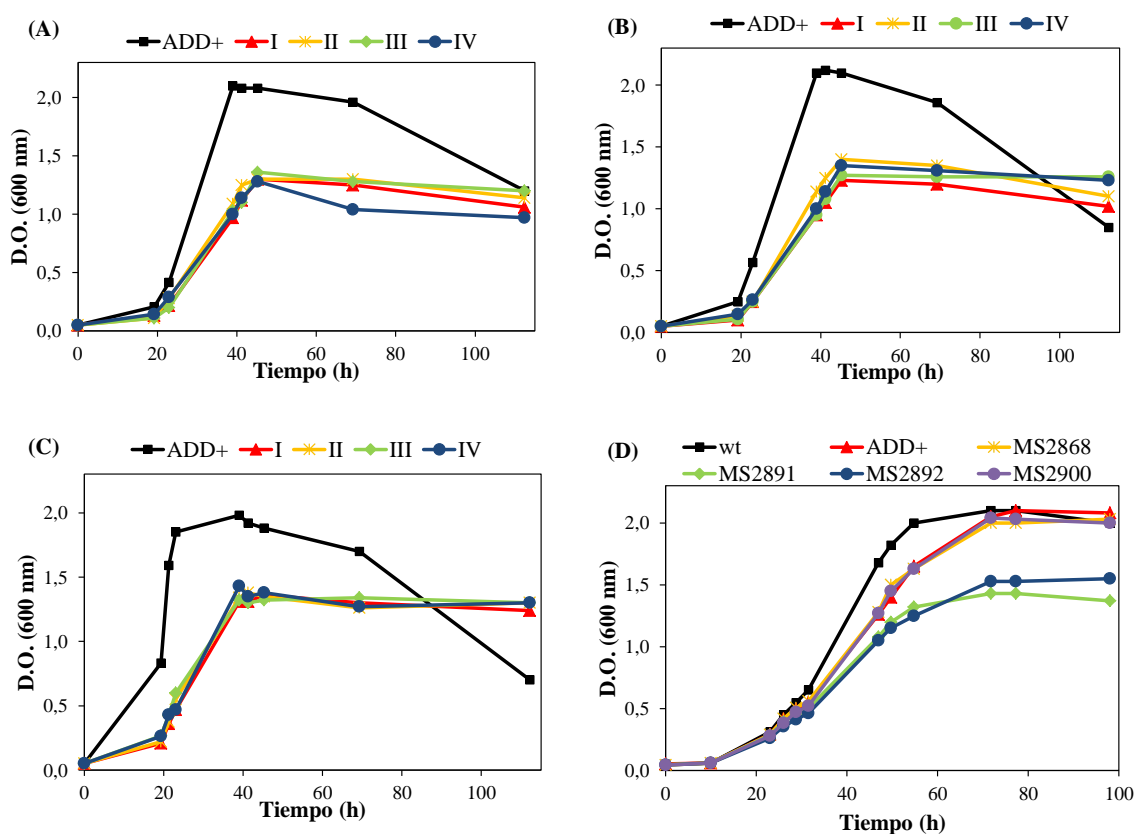
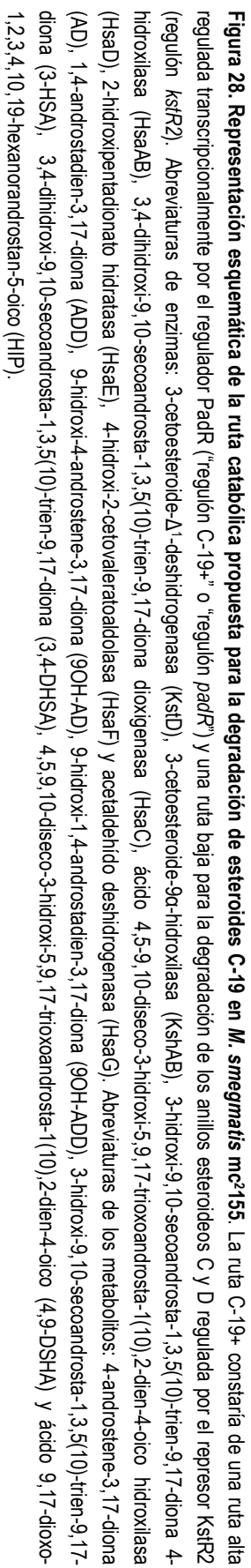


Figura 27. Curvas de crecimiento de cepas de *M. smegmatis* mc²155 en diferentes esteroides. Las cepas se cultivaron en medio mínimo 7H9 con distintos esteroides 1,8 mM como única fuente de carbono y energía: (A) AD, (B) ADD, (C) 9OH-AD o (D) colesterol. Nomenclatura de las cepas utilizadas: mc²155 [wt]; ADD+ [ADD+]; ADD+ $\Delta padR$ [MS2868]; ADD+ $\Delta hsaA2$ [MS2892]; ADD+ $\Delta hsaC2$ [MS2891]; ADD+ $\Delta hsaD2$ [MS2900]; MS6039-5941 AD+I [I]; MS6039-5941 AD+II [II]; MS6039-5941 AD+III [III]; MS6039-5941 AD+IV [IV].



1.2. Identificación del *cluster* C-19+ en otras bacterias

1.2.1. Especies de micobacterias

1.2.1.1. Comparativa genómica con especies depositadas en bases de datos

Para analizar la presencia del *cluster* C-19+ en otras especies de micobacterias, se realizaron diversos estudios *in silico*. En primer lugar, se buscaron homólogos de *padR* (MSMEG_2868), *iclR* (MSMEG_2890) y *tetR* (MSMEG_2898) en las bases de datos. A continuación, en aquellos casos en los que se encontraron similitudes de secuencia significativas, se analizó su contexto genómico con el objetivo de buscar homólogos del resto de genes presentes en el *cluster* C-19+ de *M. smegmatis*. Siguiendo esta aproximación, se observó que el *cluster* C-19+ está presente en muchas especies de micobacterias. Varias especies aisladas del medio ambiente como por ejemplo *M. vanbaalenii* PYR-1 (NC_008726.1, desde MVAN_RS14310 hasta MVAN_RS14565) y *M. neoaurum* DSM 44074 (ATCC 25795) (NZ_CCDR000000000.1, desde TY28_RS11880 hasta TY28_RS12130) presentan un *cluster* C-19+ con una organización génica muy similar a la de *M. smegmatis*. Otras micobacterias ambientales como *M. gilvum* Spyr1 (NC_014814.1, desde MSPYR1_RS19345 hasta MSPYR1_RS19570) o micobacterias patógenas no-estrictas como *M. avium subsp. paratuberculosis* str. K10, (NC_002944.2, desde MAP_RS07270 hasta MAP_RS07385) contienen un *cluster* C-19+ con algunos reordenamientos génicos. Por el contrario, varias micobacterias patógenas estrictas tales como *M. tuberculosis* H37Rv (NC_000962.3), *M. leprae* TN (NC_002677.1), *M. africanum* GM041182 (NC_015758.1) o *M. bovis* AF2122/97 (NC_002945.3), no presentan el *cluster* C-19+. El regulador TetR no está conservado en los *clusters* identificados en estas actinobacterias.

A continuación, teniendo en cuenta que *M. tuberculosis* y *M. smegmatis* son dos especies filogenéticamente próximas y que el *cluster* C-19+ sólo está presente en una de ellas, se realizó una comparación genómica entre *M. tuberculosis* H37Rv (NC_000962.3) y *M. smegmatis* mc²155 (NC_008596.1) con el objetivo de establecer los límites del *cluster* C-19+ (Fig. 29). Se observó un fuerte grado de conservación génica *upstream* y *downstream* del mismo, que apoya la hipótesis de que el *cluster* C-19+ juega un papel nutricional en micobacterias como *M. smegmatis* y por tanto, es dispensable para la supervivencia de patógenos como *M. tuberculosis*. Es interesante señalar que varios genes que codifican proteínas que podrían estar involucradas en patogénesis (p. ej., proteínas de estrés, sistemas toxina-antitoxina, proteínas de respuesta hipóxica) (Rustad *et al.*, 2009; Fernández-García *et al.*, 2016), se localizan en esa región genómica en *M. tuberculosis* en lugar del *cluster* C-19+. La delimitación del *cluster* C-19+ de *M. smegmatis* mc²155 (MSMEG_2851-MSMEG_2901) (Fig. 14), también se realizó por análisis genómicos comparativos con las especies de micobacterias arriba mencionadas que presentan una organización genética similar del mismo.

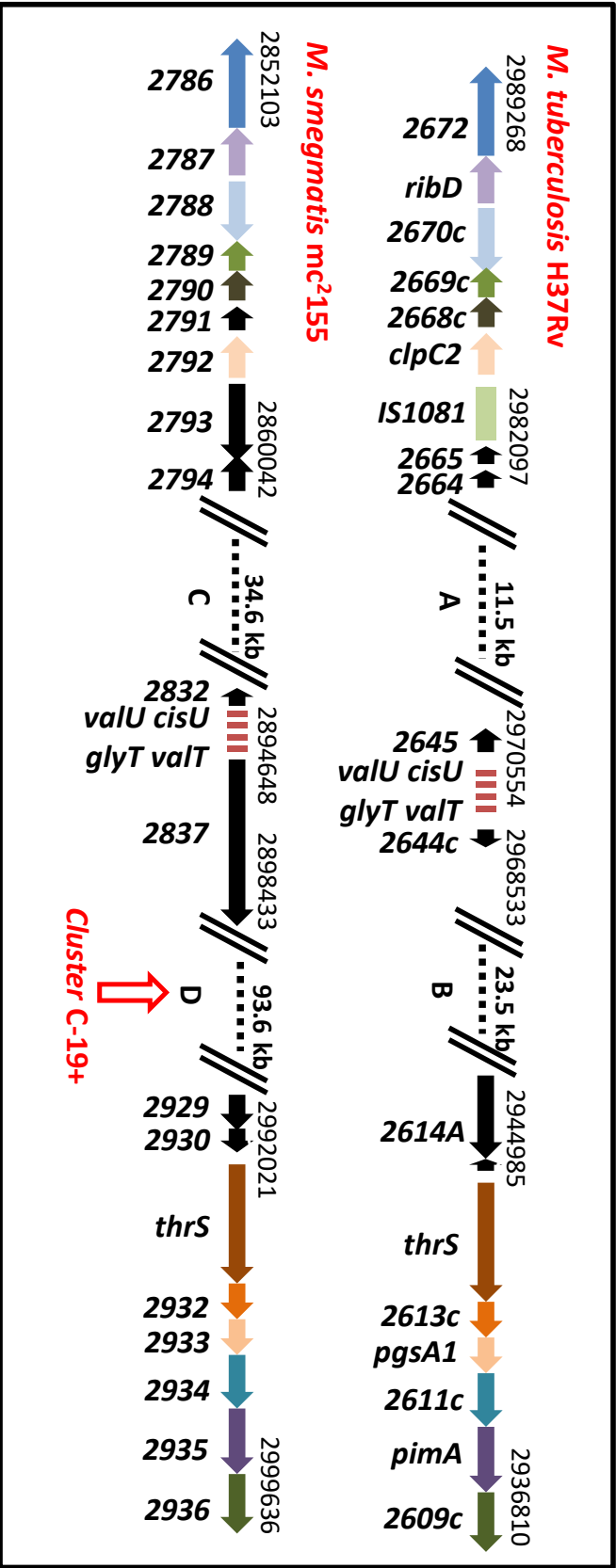


Figura 29. Representación esquemática del contexto genómico del cluster C-19+ en *M. smegmatis* mc²155 (NC_008596.1). Se muestra un análisis comparativo con el genoma de la bacteria modelo *M. tuberculosis* H37Rv (NC_000962.3). Se observa conservación genómica upstream y downstream del cluster C-19+ en *M. smegmatis*, que apoya la hipótesis de una coevolución divergente en ambas especies con adquisición/pérdida de capacidades nutricionales asociada a la adquisición/pérdida del cluster C-19+. Las regiones genómicas A y B contienen 16 y 28 genes anotados, respectivamente, codificando diversos tipos de proteínas: proteínas de profagos, toxina-antitoxina, proteínas de respuesta a hipoxia o ligasas de ARN-splicing. No se encontraron ortólogos para la mayoría de estos genes en *M. smegmatis*. Las regiones genómicas C y D contienen 37 y 91 genes anotados, respectivamente. En la región C se localizan varios genes que codifican transposasas o sistemas de dos componentes, mientras que el cluster C-19+ está localizado en la región D. No se encontraron genes ortólogos para la mayoría de los genes en *M. tuberculosis*. Los genes ortólogos se representan con el mismo color. Nomenclatura de la anotación génica: Ry(número), *M. tuberculosis*; MSMEG_(número), *M. smegmatis*.

1.2.1.2. Comparativa genómica con cepas industriales de producción de intermediarios esteroideos

A continuación, se investigó la presencia del *cluster* C-19+ en varias micobacterias utilizadas industrialmente para la producción de esteroides C-19 (AD, ADD o 9OH-AD) a partir de esteroides (Tabla 3). La mayoría de estas cepas han sido aisladas a partir de muestras ambientales y seleccionadas después de varias rondas de mutagénesis convencional. Por ejemplo, este es el caso de las cepas *M. neoaurum* VKM Ac-1815D (NC_023036.2) y *Mycobacterium* sp. NRRL B-3805 (CP011022.1) productoras de AD a partir de fitoesteroides, cuyos genomas han sido recientemente secuenciados (Shtratnikova *et al.*, 2014; Rodríguez-García *et al.*, 2016). Los análisis *in silico* indicaron que ninguna de estas dos cepas presentan el *cluster* C-19+, a pesar de su proximidad filogenética a *M. neoaurum* DSM 44074 (que sí lo presenta). Además, la comparativa genómica de estas tres cepas permitió identificar una delección precisa del *cluster* C-19+ en las cepas industriales, que se extiende desde *TY28_RS11880* hasta *TY28_RS12130* en el genoma de la cepa de referencia DSM 44074. En el caso de la cepa *Mycobacterium* sp. NRRL B-3805, se detectó una delección entre los genes *MyAD_15120* y *MyAD_1513* (Fig. 30).

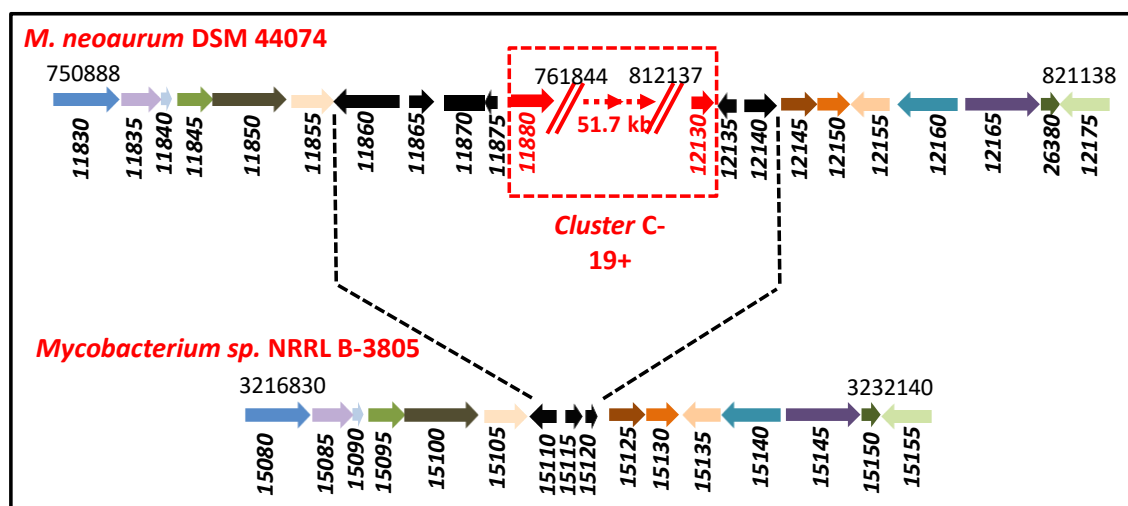


Figura 30. Identificación *in silico* de un *cluster* génico C-19+ en *M. neoaurum* DSM 44074. Se representa el contexto genómico del *cluster* (NZ_LK021338; desde *TY28_RS11880* a *TY28_RS12130*) y un análisis comparativo del mismo con la cepa industrial *Mycobacterium* sp. NRRL B-3805 (NZ_CP011022). Los genes ortólogos se representan con el mismo color. Nomenclatura de la anotación genética: *TY28_RS*(número), *M. neoaurum* DSM 44074; *MyAD_RS*(número), *Mycobacterium* sp. NRRL B-3805.

Para demostrar una correlación directa entre la presencia del *cluster* C-19+ y la capacidad de degradar esteroides C-19, se investigó la capacidad de las cepas *M. neoaurum* DSM 44074 y *Mycobacterium* sp. NRRL B-3805 de crecer en medio mínimo con AD como única fuente de carbono y energía. La cepa *M. neoaurum* DSM 44074 presentó el mismo comportamiento que *M. smegmatis*, es decir, sólo fue capaz de crecer en AD después de varios días de incubación (más de 120-150 h) (Fig. 31A) y las células aisladas al final de los cultivos adquirían un fenotipo C-19+ estable (Fig. 31B). Cuando se amplificó por PCR y se secuenció el gen *padR* en la cepa silvestre de *M. neoaurum* DSM 44074 (*TY28_RS12035*; id. proteína: WP_036470770.1) y en dos mutantes C-19+ aislados (cepas DSM44074+1

y DSM44074+2) (Tabla 7), se identificaron dos inserciones diferentes de un nucleótido (221_222insG y 210_211insT, respectivamente) que generaban proteínas PadR truncadas. Estos resultados confirmaron el papel del *cluster* C-19+ en la adquisición del fenotipo C-19+, así como la participación de *padR* en la regulación del *cluster* en otras micobacterias. Finalmente, se confirmó que *Mycobacterium* sp. NRRL B-3805 no era capaz de crecer en AD como única fuente de carbono y energía (Fig. 31C). Estos cultivos fueron prolongados durante más de 500 h y no se observó crecimiento.

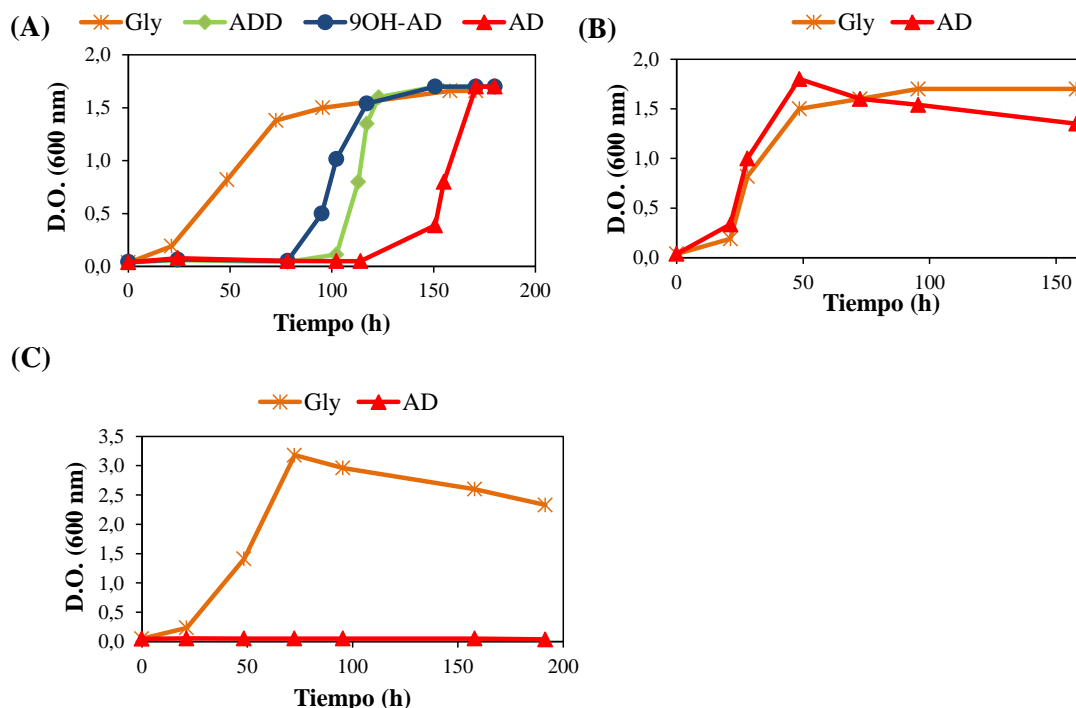


Figura 31. Curvas de crecimiento de cepas de *Mycobacterium* en diferentes fuentes de carbono. (A) *M. neoaurum* DSM 44074 (B) *M. neoaurum* DSM 44074+1 (C) *Mycobacterium* sp. NRRL B-3805. Las cepas se cultivaron en medio mínimo 7H9 a 30°C con glicerol 18 mM (naranja) o distintos esteroides 1,8 mM como única fuente de carbono y energía: AD (rojo), ADD (verde) o 9OH-AD (azul).

1.2.2. Otras actinobacterias modelo degradadoras de esteroides

Después de haber identificado la presencia del *cluster* C-19+ en varias especies de micobacterias, se decidió expandir la búsqueda a otras actinobacterias modelo de degradación de esteroides. A continuación, se muestran las comparativas genómicas realizadas con las bacterias *G. neofelifaecis* NRRL B-59395, *R. jostii* RHA1 y *Nocardioides simplex* VKM Ac-2033D.

1.2.2.1. Comparativa genómica con *G. neofelifaecis* NRRL B-59395

En este trabajo se investigó la presencia de un *cluster* C-19+ homólogo en el genoma de la bacteria *G. neofelifaecis* NRRL B-59395 (NZ_AEUD00000000.1). En primer lugar, se analizó la presencia de genes homólogos de los reguladores transcripcionales (*padR*, *iclR* y *tetR*) y después, de los genes que codifican las proteínas involucradas en la ruta catabólica C-19+ postulada en *M. smegmatis* (Fig. 28). En estos análisis *in silico* comprobamos que esta bacteria presenta redundancias génicas para

la mayor parte de los genes clave de metabolismo de esteroides (Tabla 16). Li *et al.* (2014) ya habían anotado tres *clusters* génicos involucrados en la degradación de colesterol y/o AD: *cluster* 1 (SCNU_08561-SCNU_09376), *cluster* 2 (SCNU_18995-SCNU_19105) y *cluster* 3 (SCNU_16573-SCNU_16798). De acuerdo a nuestros análisis, probablemente existe un *cluster* C-19+ análogo localizado en la región genómica SCNU_18710- SCNU_18770 (*cluster* 2) (Fig. 32). De hecho, estos genes se vieron previamente sobreexpresados en presencia de AD y colesterol en análisis de *RNA-seq* (Li *et al.*, 2014). Próximos a esta región genómica también se localizaron otros homólogos como ejemplo los genes SCNU_19025, SCNU_19075 y SCNU_19140 que codifican proteínas con una identidad proteica del 64%, 70% y 45% a las proteínas esteroide monooxigenasa (MSMEG_2888), deshidrogenasa (MSMEG_2885) y lipasa (MSMEG_2888), respectivamente, identificadas en *M. smegmatis*.

Por otra parte, únicamente se anotó un único posible operón *hsaEFG* (SCNU_07025-SCNU_07035) en el genoma. Aparentemente, también sólo existe un grupo de genes que codifican las enzimas de la ruta baja del catabolismo de esteroides (regulón *kstR2*) localizado en otra región genómica distinta de los *clusters* anotados. El gen SCNU_14024 codifica un posible regulador TetR con una identidad proteica del 58% a KstR2 (MSMEG_6009). Alrededor de este gen, se localizan otros homólogos del regulón *kstR2* (p.ej., el posible operón SCNU_14039-SCNU_14044 es homólogo a MSMEG_6011-MSMEG_6012).

Proteína (Gen)	Cluster 2	Cluster 3	Otras localizaciones
PadR (MSMEG_2868)	SCNU_19015 (47)	-	SCNU_06990 (39)
IclR (MSMEG_2890)	SCNU_19010 (64)	-	Múltiples (<49%)
TetR (MSMEG_2898)	-	-	-
KstD2 (MSMEG_2869)	SCNU_19035 (42) SCNU_19030 (33)	SCNU_16673 (42)	-
KstD3 (MSMEG_2867)	SCNU_19030 (64) SCNU_19035 (37)	SCNU_16673 (36)	-
KshA2 (MSMEG_2870)	SCNU_18995 (*)	SCNU_16633 (57)	-
KshB2 (MSMEG_2893)	-	-	SCNU_18062(57) SCNU_05586 (46)
HsaA2 (MSMEG_2892)	SCNU_19000 (69)	SCNU_16628 (39)	-
HsaB1 (MSMEG_6035)	SCNU_19020 (42)	SCNU_16618 (58)	-
HsaC2 (MSMEG_2891)	SCNU_19005 (71)	SCNU_16623 (48)	-
HsaD2 (MSMEG_2900)	SCNU_19055 (76)	-	SCNU_11540 (65)
HsaE (MSMEG_5940)	-	-	SCNU_07025 (40)
HsaF (MSMEG_5939)	-	-	SCNU_07030 (55)
HsaG (MSMEG_5937)	-	-	SCNU_07035 (46)

Tabla 16. Identificación *in silico* de genes homólogos involucrados en la degradación de esteroides en el genoma de *G. neofelificis* NRRL B-59395. Se muestra la anotación génica antigua (NZ_AEUD00000000.1) y la designación de los *clusters* génicos de catabolismo de esteroides previamente realizada por Li *et al.* (2014). Se han determinado las identidades proteicas utilizando como referencia las proteínas involucradas en la ruta catabólica C-19+ postulada de *M. smegmatis* mc²155 y se muestran entre paréntesis. Únicamente se muestran posibles genes homólogos localizados en otras regiones genómicas si codifican proteínas con una identidad proteica mayor del 39%. (*) Proteína truncada situada al límite del *contig* 24.

1.2.2.2. Comparativa genómica con *R. jostii* RHA1

La bacteria modelo *R. jostii* RHA1 presenta numerosas redundancias génicas en el catabolismo de esteroides. Se han descrito hasta cuatro *clusters* génicos involucrados en la degradación de esteroides: *cluster* 1 (*RHA1_ro04531-RHA1_ro04705*), *cluster* 2 (*RHA1_ro02478-RHA1_ro02492*), *cluster* 3 (*RHA1_ro05787-RHA1_ro05833*) y *cluster* 4 (*RHA1_ro09002-RHA1_ro09040*), éste último presente en el plásmido pRHL1 (van der Geize *et al.*, 2007; Mathieu *et al.*, 2010; Mohn *et al.*, 2012; Haußmann *et al.*, 2013). Cada uno de estos *clusters* contiene genes que codifican distintas KstD, KshAB y/u otras enzimas que modifican los anillos A y B del núcleo esteroideo. Se ha demostrado que el *cluster* 1 y el *cluster* 3 codifican las enzimas responsables del catabolismo del colesterol y de ácidos biliares (colato y sus derivados), respectivamente.

En este trabajo se analizó si el *cluster* C-19+ de *M. smegmatis* es homólogo a alguno de los *clusters* descrito en esta bacteria. Para ello, se analizó de nuevo la presencia de genes homólogos de los reguladores transcripcionales (*padR*, *iclR* y *tetR*) y de los genes que codifican las proteínas involucradas en la ruta catabólica C-19+ postulada en *M. smegmatis* (Fig. 28). Además de identificar homólogos de *padR* e *iclR* en los *clusters* 2 y 4, se observó que para la mayoría de los casos las identidades proteicas de las enzimas homólogas del *cluster* C-19+ eran más altas para estos dos *clusters* (p. ej., HsaA2) (Tabla 17). Próximos a estos genes también se localizaron otros genes homólogos en estas regiones genómicas. Por ejemplo, los genes *RHA1_ro09035* y *RHA1_ro02492* codifican posibles esteroide monooxigenasas con identidades proteicas del 65% y 66% a Smo (*MSMEG_2894*), respectivamente. Otro ejemplo son los genes *RHA1_ro09036* y *RHA1_ro02486* que codifican posibles proteínas con identidades del 46% y 53% a la proteína codificada por *MSMEG_2888*, respectivamente.

Probablemente el *cluster* 2 presenta mayor similitud (en cuanto a organización génica y contenido génico) al *cluster* génico descrito en *G. neofelifaecis*, mientras que el *cluster* 4 presenta una mayor similitud al *cluster* C-19+ de *M. smegmatis*. De hecho, muchos de los genes de la región *MSMEG_2874-MSMEG_2889* que no son fácilmente anotables, presentan sus correspondientes homólogos en el *cluster* 4. Por ejemplo, el posible operón *RHA1_ro09016-RHA1_ro09017* codifica dos proteínas con identidades del 51% a las proteínas del operón anotado *MSMEG_2887-MSMEG_2886* en este trabajo y el gen *RHA1_ro09007* codifica posiblemente una proteína con una identidad del 70% a la proteína codificada por *MSMEG_2885*. Las enzimas KstDs y KshA del mismo, son homólogas a las enzimas encontradas en otras bacterias del género *Rhodococcus* que han demostrado ser relevantes en la degradación de esteroides C-19. Por ejemplo, Fernández de las Heras *et al.* (2012) observaron que la enzima KstD2 está involucrada en la degradación de AD/9OH-AD en *R. ruber* str. Chol-4 y es ortóloga a la proteína codificada por el gen *RHA1_ro09023* de *R. jostii* RHA1. Por otra parte, en el genoma se anotaron distintos posibles operones *hsaEFG* localizados en los *clusters* 1, 3 y 4. En cambio, las distintas rutas catabólicas de esteroides parecen converger en una única ruta baja (regulón *kstR2*) localizada en el *cluster* 1 (Kendall *et al.*, 2010; Mohn *et al.*, 2012; Casabon *et al.*, 2013).

Por último, resulta importante mencionar que este *cluster* está presente en otras muchas especies del género *Rhodococcus*. Por ejemplo, la bacteria *R. ruber* str. Chol-4 podría contener un *cluster* C-19+ en las inmediaciones de los genes *D092_19450-D092_19480* (ANGC02000009.1).

Proteína (Gen)	Cluster 1	Cluster 2	Cluster 3	Cluster 4	Otras localizaciones
PadR (MSMEG_2868)	-	ro02485 (47)	-	ro09017 (47)	-
IclR (MSMEG_2890)	-	ro02487 (63)	-	ro09022 (53)	Otros <43%
TetR (MSMEG_2898)	-	-	-	-	-
KstD2 (MSMEG_2869)	ro04532 (45)	ro02483 (43)	ro05798 (46) ro05813 (35)	ro09040 (66) ro09023 (68)	-
KstD3 (MSMEG_2867)	ro04532 (36)	ro02483 (38)	ro05798 (37) ro05813 (47)	ro09040 (36) ro09023 (36)	-
KshA2 (MSMEG_2870)	ro04538 (60)	ro02490 (60)	ro05811 (66)	ro09003 (60)	-
KshB2 (MSMEG_2893)	-	-	ro05833 (66)	ro09002 (48)	ro06056 (62)
HsaA2 (MSMEG_2892)	ro04539 (40)	ro02489 (72)	ro05802 (59)	ro09004 (64)	ro05068 (62)
HsaB1 (MSMEG_6035)	ro04542 (71)	-	ro05796 (45)	ro09012 (39)	ro08962 (50) ro02484 (48) ro05398 (46)
HsaC2 (MSMEG_2891)	ro04541 (49)	ro02488 (72)	ro05803 (63)	ro09005 (63)	-
HsaD2 (MSMEG_2900)	ro04540 (42)	-	ro05797 (71)	ro09014 (62)	-
HsaE (MSMEG_5940)	ro04533 (75)	-	ro05799 (62)	ro09021 (59)	-
HsaF (MSMEG_5939)	ro04534 (88)	-	ro05800 (71)	ro09018 (63)	ro10116 (60) ro03866 (60) ro08084 (57) ro00516 (55)
HsaG (MSMEG_5937)	ro04535 (85)	-	ro05801 (75)	ro09019 (57)	ro08083 (50)

Tabla 17. Identificación *in silico* de genes homólogos involucrados en la degradación de esteroides en el genoma de *R. jostii* RHA1. Se muestra la anotación génica antigua (cromosoma: NC_008268.1, plásmido pRHL1: NC_008269.1) y la designación de los *clusters* génicos de catabolismo de esteroides previamente realizada por Mohn *et al.* (2012). Se han determinado las identidades proteicas utilizando como referencia las proteínas involucradas en la ruta catabólica C-19+ postulada de *M. smegmatis* mc²155 y se muestran entre paréntesis. Únicamente se muestran posibles genes homólogos localizados en otras regiones genómicas si codifican proteínas con una identidad proteica mayor del 40%. Nomenclatura génica: RHA1_ro(número).

1.2.2.3. Comparativa genómica con *N. simplex* VKM Ac-2033D

En este trabajo también se investigó la presencia de un *cluster* C-19+ homólogo en el genoma de la bacteria *N. simplex* VKM Ac-2033D, también conocida con el nombre de *Pimelobacter simplex* (NZ_CP009896.1). Esta cepa presenta gran interés biotecnológico por su capacidad de introducir $\Delta 1,2$ -deshidrogenaciones en 3-cetoesteroides y reducir los grupos carbonilos del C-17 y C-20 de androstanos y

Resultados

pregnanos, respectivamente, entre otras aplicaciones (Shtratnikova *et al.* (2016)).

Como se realizó en los análisis anteriores, se buscó en su genoma la presencia de genes homólogos de los reguladores transcripcionales (*padR*, *iclR* y *tetR*) y de los genes que codifican las proteínas involucradas en la ruta catabólica C-19+ postulada en *M. smegmatis* (Fig. 28). En estos análisis *in silico* comprobamos que esta bacteria presenta redundancias génicas para la mayor parte de los genes clave de metabolismo de esteroides (Tabla 18). Shtratnikova *et al.* (2016) ya habían anotado cinco posibles *clusters* génicos involucrados en la degradación de esteroides: *cluster A* (KR76_14160-KR76_14505), *cluster B* (KR76_12190-KR76_12345), *cluster C* (KR76_25015-KR76_25200), *cluster D* (KR76_27035-KR76_27130) y *cluster E* (KR76_17995-KR76_18070). En nuestros análisis se identificó un posible *cluster* de esteroides análogo al *cluster C-19+* localizado en la región genómica KR76_27070-KR76_27130, que es parte del *cluster D* anotado (Fig. 32). A diferencia de lo observado en otras especies de actinobacterias, no se encontró ningún regulador transcripcional *padR*, *iclR* ni *tetR* homólogo en esta región genómica de *N. simplex*. Sin embargo, se anotaron posibles homólogos en otras partes del genoma (Tabla 18). Por otra parte, únicamente se identificó un único posible operón *hsaEFG* (KR76_14495 - KR76_14485) en los *clusters* de esteroides anotados (Tabla 18). En la misma línea, Shtratnikova *et al.* (2016) anotaron en el genoma un único regulón *kstR2* involucrado en el catabolismo de esteroides que se localiza en el *cluster A*.

Proteína (Gen)	Cluster A	Cluster C	Cluster D	Cluster E	Otras localizaciones
PadR (MSMEG_2868)	-	KR76_25170 (52)	-	-	-
IclR (MSMEG_2890)	-	-	-	KR76_18060 (43)	KR76_24185 (42) KR76_02270 (41)
TetR (MSMEG_2898)	-	-	-	-	-
KstD2 (MSMEG_2869)	KR76_14500 (44)	-	KR76_27125 (66) KR76_27115 (34)	-	KR76_01140 (44) KR76_02655 (32)
KstD3 (MSMEG_2867)	KR76_14500 (36)	-	KR76_27125 (39) KR76_27115 (68)	-	KR76_01140 (37) KR76_02655 (41)
KshA2 (MSMEG_2870)	KR76_14170 (55)	-	KR76_27070 (64)	KR76_18045 (69)	-
KshB2 (MSMEG_2893)	KR76_14160 (50)	-	KR76_27080 (53)	-	-
HsaA2 (MSMEG_2892)	KR76_14480 (37)	-	KR76_27100 (54)	-	-
HsaB1 (MSMEG_6035)	KR76_14465 (54)	KR76_25045 (46)	KR76_27090 (46)	-	-
HsaC2 (MSMEG_2891)	KR76_14470 (51)	-	KR76_27095 (62)	-	-
HsaD2 (MSMEG_2900)	KR76_14475 (43)	-	KR76_27085 (63)	-	-
HsaE (MSMEG_5940)	KR76_14495 (39)	-	-	-	KR76_24180 (37)
HsaF (MSMEG_5939)	KR76_14490 (71)	-	-	-	KR76_24175 (58)
HsaG (MSMEG_5937)	KR76_14485 (77)	-	-	-	KR76_24170 (49)

Tabla 18. Identificación *in silico* de genes homólogos involucrados en la degradación de esteroides en el genoma

de *N. simplex* VKM Ac-2033D. Se muestra la anotación génica antigua (NZ_CP009896.1) y la designación de los *clusters* génicos de catabolismo de esteroides previamente realizada por Shtratnikova *et al.* (2016). Se han determinado las identidades proteicas utilizando como referencia las proteínas involucradas en la ruta catabólica C-19+ postulada de *M. smegmatis* mc²155 y se muestran entre paréntesis. Únicamente se muestran posibles genes homólogos localizados en otras regiones genómicas si codifican proteínas con una identidad proteica significativa (mayor del 32%) y/o se encuentran próximos a otros genes anotados en este trabajo.

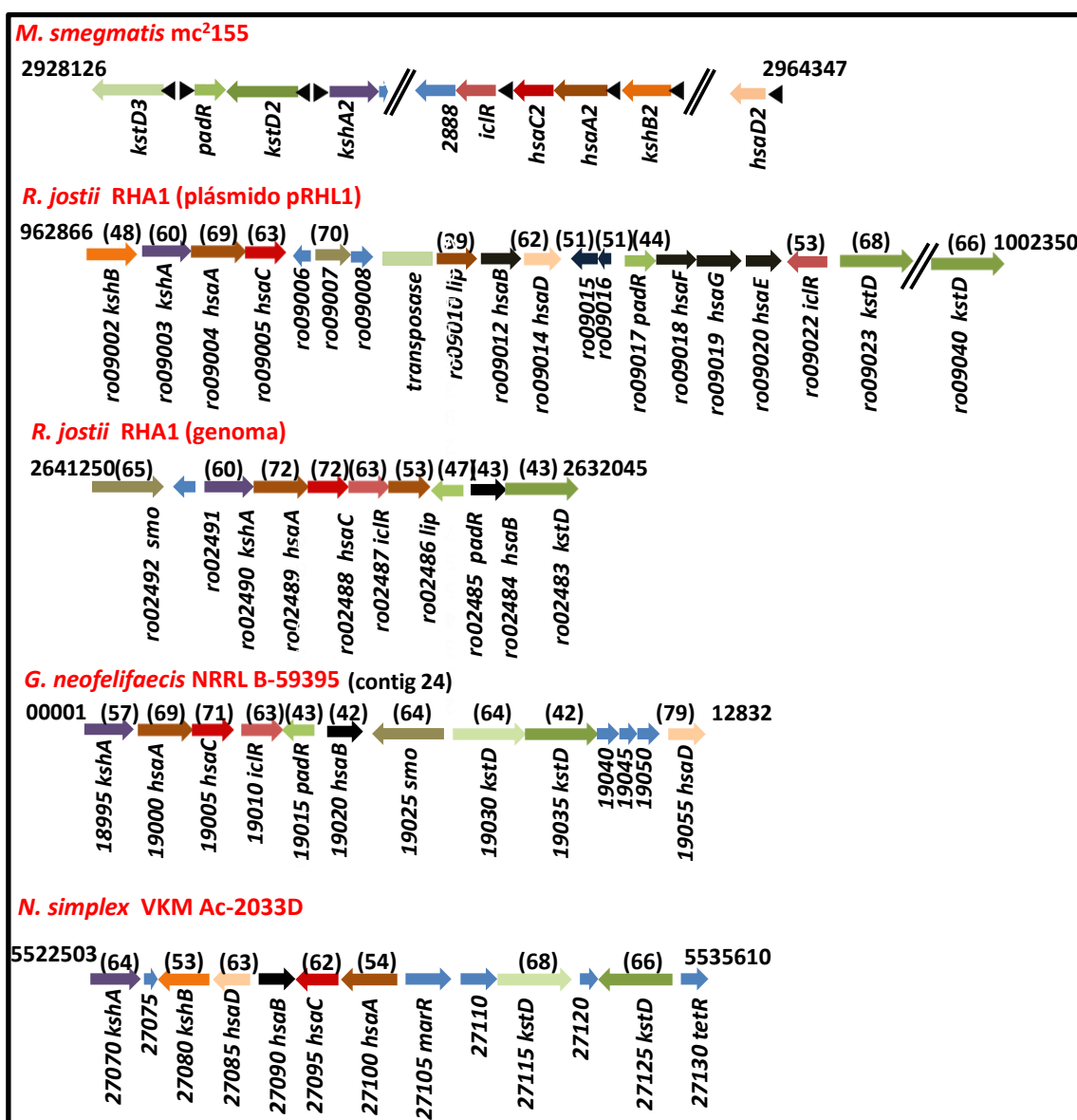


Figura 32. Identificación *in silico* de posibles *clusters* génicos C-19+ en *R. jostii* RHA1, *G. neofelifaecis* NRRL-B59395 y *N. simplex* VKM Ac-2033D. Se representa el contexto genómico de los posibles *clusters* y un análisis comparativo del mismo con la cepa *M. smegmatis* mc²155. Las identidades proteicas, determinadas utilizando como referencia las proteínas del *cluster* C-19+ de *M. smegmatis* mc²155, se muestran entre paréntesis. Los genes ortólogos se representan con el mismo color. Nomenclatura de la anotación génica: MSMEG_(número), *M. smegmatis* mc²155; SCNU_(número), *G. neofelifaecis* NRRL-B59395; RHA1_ro(número), *R. jostii* RHA1; KR76_(número), *N. simplex* VKM Ac-2033D. Secuencias genómicas de referencia: *M. smegmatis* mc²155 (NC_008596.1); *G. neofelifaecis* NRRL-B59395 (NZ_AEUD00000000.1); *R. jostii* RHA1 (NC_008268.1, NC_008269.1); *N. simplex* VKM Ac-2033D (NZ_CP009896.1).

1.2.3. Otras especies de actinobacterias

Con el objetivo de identificar la presencia del *cluster* C-19+ en otros géneros de actinobacterias, se analizó en las bases de datos la existencia de posibles reguladores transcripcionales y/o proteínas homólogas a las descritas en la ruta catabólica C-19+ de *M. smegmatis* (p. ej., PadR, IclR, KshA2, HsaC2, HsaA2, KstD2, KstD3). De esta manera, se identificaron múltiples especies de distintos géneros (p.ej., *Nocardia*, *Streptomyces*, *Amycolatopsis*, *Actinomadura*, *Thermomonospora*) que contenían genes homólogos. A continuación, se decidió estudiar con mayor detalle la organización genómica de los *clusters* identificados en algunas de estas bacterias. En la Tabla 19 se muestran algunos de los posibles *clusters* C-19+ identificados y algunos de sus genes homólogos correspondientes:

Organismo	PadR	IclR	KshA2	KstD	HsaA2	HsaC2
<i>Nocardia cyriacigerogica</i>	12050 (46)	12060 (76)	12075 (60)	12025 (43 KstD2) 12035 (71 KstD3)	12070 (73)	12065 (76)
<i>Nocardia fusca</i>	31935 (50)	32020 (71)	32035 (60)	31915 (42-KstD2) 31925 (70-KstD3)	32030 (74)	32025 (76)
<i>Thermomonospora curvata</i>	01120* (35)	17355 (48)	17285 (70)	17340 (46 KstD2) 17250 (46 KstD3)	17330 (61)	17320 (62)
<i>Spirillospora albida</i>	-	0114630 (47)	0124395* (66)	0114645 (44 KstD2) 0124380* (44 KstD3)	0114655 (66)	114660 (62)
<i>Actinomadura rifamycini</i>	0127365* (54) 0127380* (50)	0104195 (48)	0104065 (67)	39700 (46 KstD2) 0104030 (46 KstD3)	0104170 (65)	0104165 (61)

Tabla 19. Identificación *in silico* de un *cluster* C-19+ en el genoma de varias actinobacterias. Se han determinado las identidades proteicas utilizando como referencia las proteínas involucradas en la ruta catabólica C-19+ postulada de *M. smegmatis* mc²155 y se muestran entre paréntesis. Únicamente se muestran posibles genes homólogos localizados en la región genómica identificada y en aquellos casos en los que se no encontró un posible gen homólogo candidato se buscó en otras regiones genómicas (*). Nomenclatura génica: NOCYR_RS(número), *N. cyriacigerogica*; NF4_RS(número), *N. fusca*; TCUR_RS(número), *T. curvata*; IE99_RS(número), *S. albida*; H505_RS(número), *A. rifamycini*. Secuencias genómicas: *N. cyriacigerogica* (NC_016887.1); *N. fusca* (NZ_BDCU01000055.1); *T. curvata* (NC_013510.1); *S. albida* (NZ_JOFJ01000009.1); *A. rifamycini* (NZ_AULB01000007.1).

1.2.4. Análisis filogenéticos de *clusters* de catabolismo de esteroides

Con el objetivo de investigar las relaciones filogenéticas de los *clusters* de catabolismo de esteroides anteriormente identificados, se llevaron a cabo diversos análisis filogenéticos. Estos análisis se realizaron utilizando las secuencias proteicas KshA/CtCNB1_1306, HsaA/TesA1, HsaC/TesB, HsaD/TesD y KstD/TesH de diez cepas de referencia degradadoras de esteroides: *M. smegmatis* mc²155, *M. tuberculosis* H37Rv, *M. neoaurum* DSM 44074, *M. neoaurum* VKM Ac-1815D, *Mycobacterium* sp. NRRL B-3805, *R. jostii* RHA1, *G. neofelificis* NRRL-B59395, *N. simplex* VKM Ac-2033D y *C. testosteroni* CNB-2. La identificación de los posibles genes homólogos involucrados en el catabolismo de esteroides en las distintas especies se realizó previamente en los estudios de anotación de *clusters* C-19+ (ver apartados previos). Las secuencias homólogas fueron alineadas usando el algoritmo Muscle (Edgar, 2004). La reconstrucción filogenética se realizó en el software MEGA v7.0 (Kumar *et al.*, 2016), utilizando el Modelo de Máxima Verosimilitud (*Maximum Likelihood Model*) con los parámetros predeterminados y fue validado

por el Método de Bootstrap con 100 réplicas. Las nomenclaturas génicas utilizadas en los árboles filogenéticos fueron: *Mvan*_(número), *M. vanbaalenii* PYR-1 (NC_008726.1); *Rv*_(número), *M. tuberculosis* H37Rv (NC_000962.3); *TY28_RS*_(número), *M. neoaurum* DSM 44074 (NZ_LK021338); *D174_RS*_(número), *M. neoaurum* VKM Ac-1815D (NC_023036.2); *MyAD_RS*_(número), *Mycobacterium* sp. NRRL B-3805 (NZ_CP011022); *RHA1_ro*_(número), *R. jostii* RHA1 (cromosoma: NC_008268.1, plásmido pRHL1: NC_008269.1); *SCNU*_(número), *G. neofelificis* NRRL-B59395 (NZ_AEUD00000000.1); *KR76*_(número), *N. simplex* VKM Ac-2033D (NZ_CP009896.1); *CtCNB1*_(número), *C. testosteroni* CNB-2 (NC_013446.2). En el caso de *M. smegmatis* mc²155 se utilizó la nomenclatura previamente adoptada en este trabajo, en la que se utilizó el número 1 para nombrar los genes del *cluster* del catabolismo del colesterol y el número 2 para los genes del *cluster* C-19+ (p. ej., *kshA1* y *kshA2* para referirse a los genes *kshA* del *cluster* del colesterol y C-19+, respectivamente; ver Tablas 12-13). Los resultados obtenidos en los análisis filogenéticos se muestran en las Fig. 33-37.

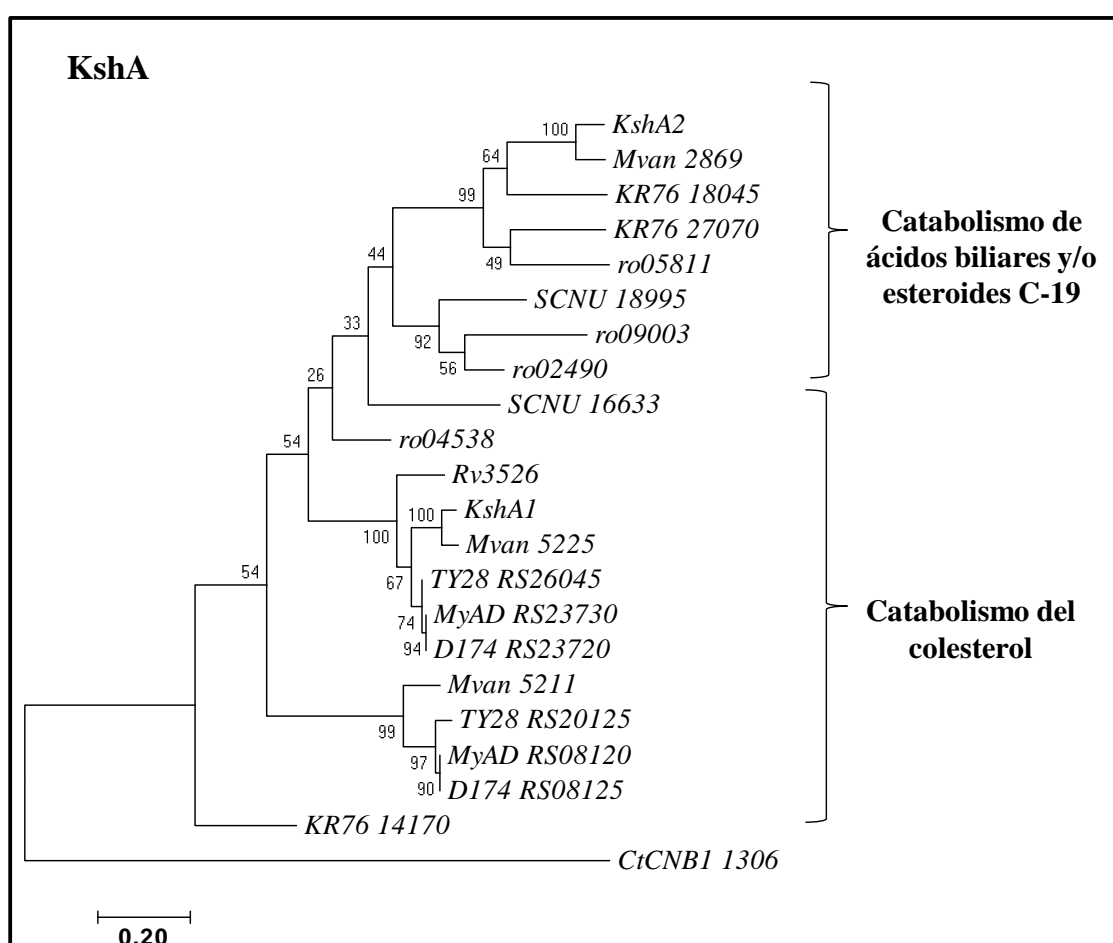


Figura 33. Filogenia de proteínas ortólogas KshA. Los números de acceso a la base de datos NCBI (o locus de las secuencias genómicas) se muestran en la figura. La escala corresponde a 0,2 sustituciones por aminoácidos.

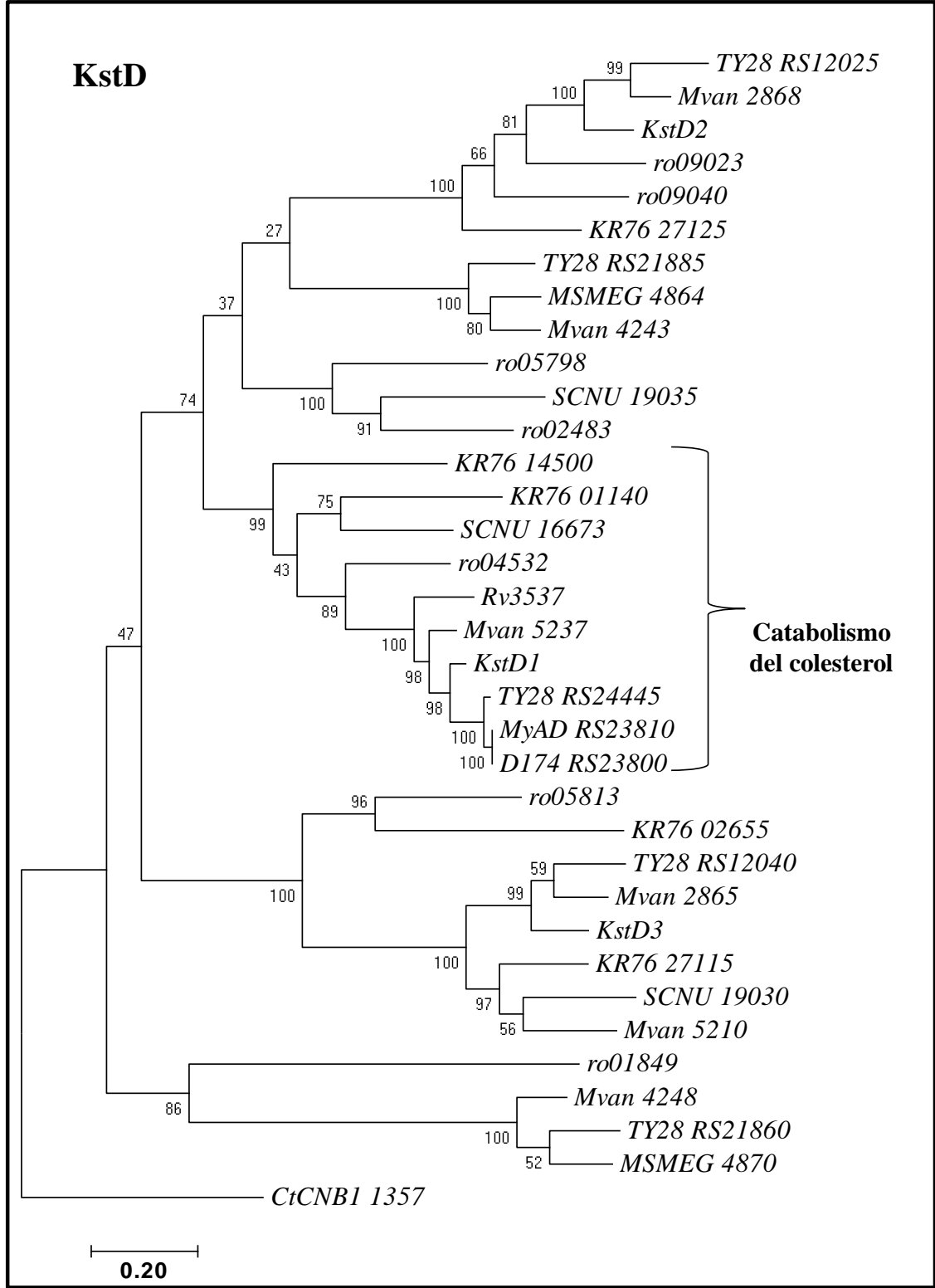


Figura 34. Filogenia de proteínas ortólogas KstD. Los números de acceso a la base de datos NCBI (o locus de las secuencias genómicas) se muestran en la figura. La escala corresponde a 0,2 sustituciones por aminoácidos.

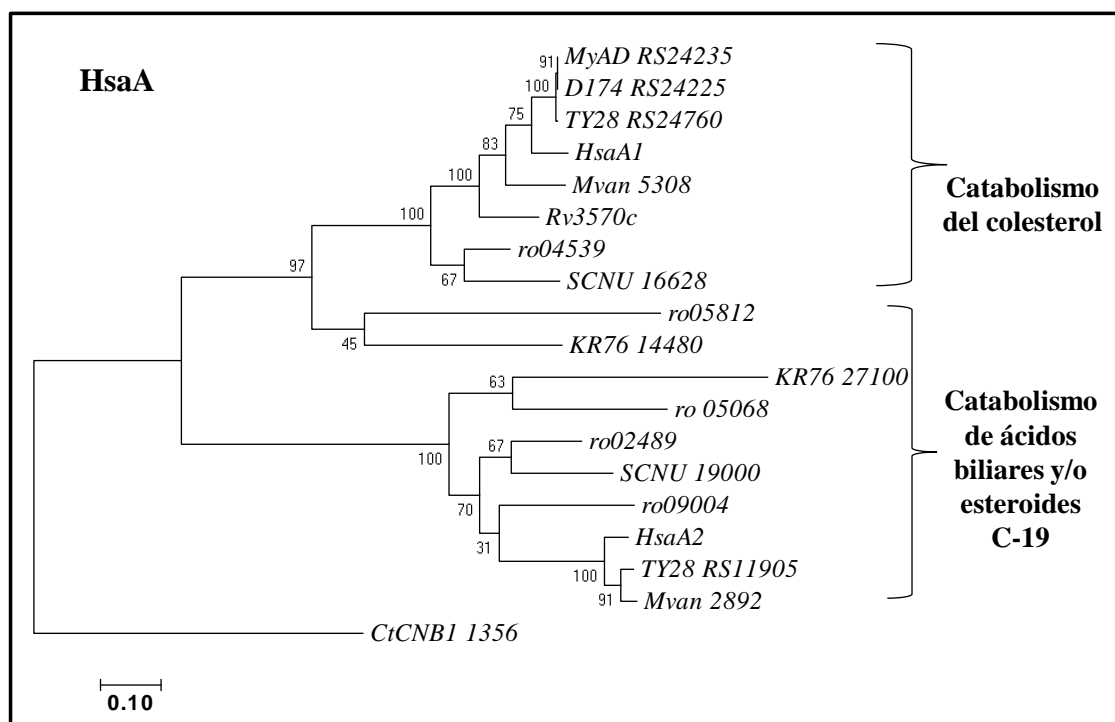


Figura 35. Filogenia de proteínas ortólogas HsaA. Los números de acceso a la base de datos NCBI (o locus de las secuencias genómicas) se muestran en la figura. La escala corresponde a 0,1 sustituciones por aminoácidos.

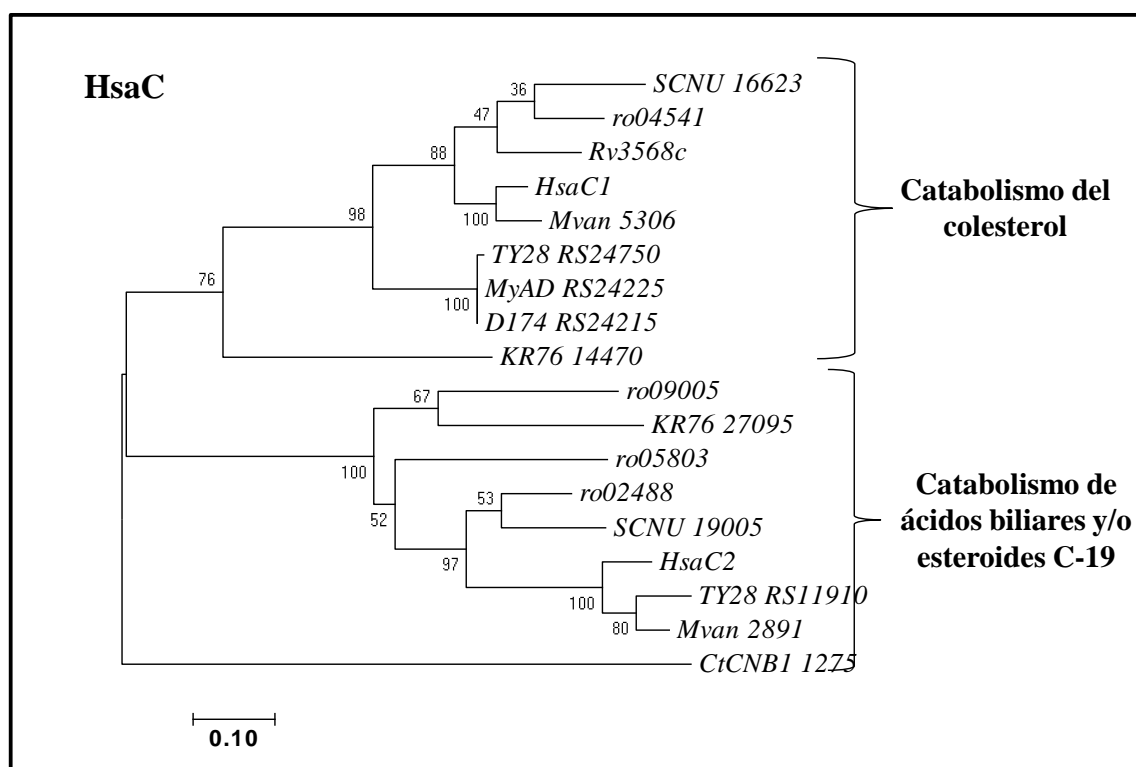


Figura 36. Filogenia de proteínas ortólogas HsaC. Los números de acceso a la base de datos NCBI (o locus de las secuencias genómicas) se muestran en la figura. La escala corresponde a 0,1 sustituciones por aminoácidos

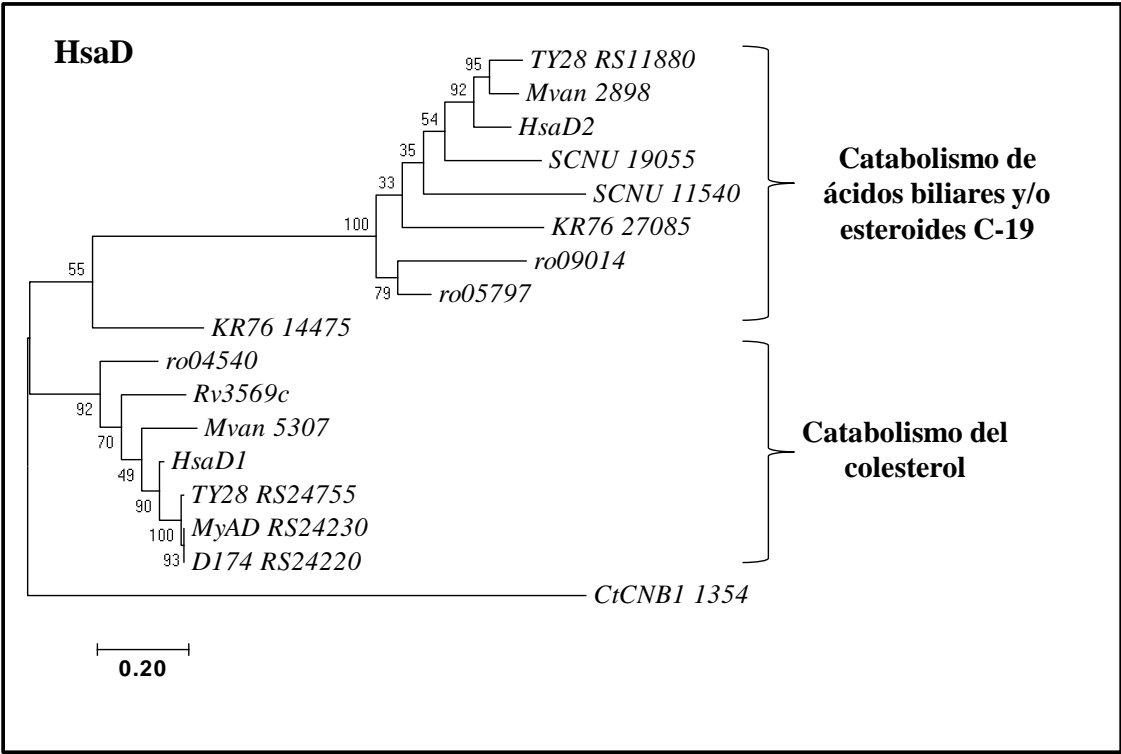


Figura 37. Filogenia de proteínas ortólogas HsaD. Los números de acceso a la base de datos NCBI (o locus de las secuencias genómicas) se muestran en la figura. La escala corresponde a 0,2 sustituciones por aminoácidos.

2. *M. smegmatis*: una biofactoría para la producción de esteroides

La utilización de biocatalizadores microbianos en los procesos de modificación y/o transformación de esteroides presenta ciertas ventajas respecto al uso de catalizadores químicos y/o enzimáticos. En este sentido, en la Biotecnología de Esteroides se han utilizado tradicionalmente microorganismos aislados del medio ambiente que presentan ciertas actividades enzimáticas de interés (Ver Apartado 2.2., Introducción). Dado que estos procesos pueden ser poco selectivos (aparición de subproductos no deseados) y en ocasiones requieren del cultivo de microorganismos patógenos oportunistas, en los últimos años se ha explorado la aplicación de aproximaciones de Ingeniería Metabólica y Biología Sintética en el desarrollo de biofactorías celulares alternativas. En esta Tesis Doctoral, se propone la utilización de *M. smegmatis* mc²155 como biofactoría para la producción de esteroides. A continuación, se enumeran las características que hacen de esta bacteria una biofactoría potencial para este propósito:

- Bacteria no patógena (Nivel de Bioseguridad tipo I; Colección de microorganismos ATCC, *American Type Culture Collection*).
- Genoma secuenciado (RefSeq: NC_008596.1).
- Crecimiento relativamente rápido en medios de cultivos baratos (p.ej., μ_{\max} (glicerol): 0,24 h⁻¹; μ_{\max} (glucosa): 0,32 h⁻¹; μ_{\max} (arabinosa): 0,27 h⁻¹; μ_{\max} (xilosa): 0,22 h⁻¹; Titgemeyer *et al.*, 2007). Ausencia de requerimientos nutricionales complejos.
- Disponibilidad de herramientas de manipulación genética (p.ej., vectores suicida, vectores de expresión y *recombineering*) (Stover *et al.*, 1991; Jackson *et al.*, 2001; Murphy *et al.*, 2015).
- Bacteria modelo de catabolismo de esteroides (García *et al.*, 2012).
- Tolerancia a concentraciones altas de sustratos y/o productos esteroideos (p.ej., >10 g/L de fitoesteroides; Galán *et al.*, 2017).
- Capacidad de transportar eficazmente sustratos y/o productos esteroideos (p.ej., esteroides, corticoesteroides, progesterona o esteroides C-19) (Galán *et al.*, 2017; Felpeto-Santero, 2016; ver Apartado 1 de Resultados).
- Incapacidad de mineralizar determinados sustratos y/o productos esteroideos relevantes (p.ej., corticoesteroides, progesterona o esteroides C-19) (Felpeto-Santero, 2016; ver Apartado 1).
- Tolerancia a medios complejos utilizados para solubilizar esteroides en los procesos de transformación microbiana industriales (p. ej., aceites, solventes orgánicos) (Galán *et al.*, 2017).

En este Apartado se analizará la utilidad de *M. smegmatis* mc²155 como biofactoría celular para la producción de esteroides estudiando tres ejemplos prácticos de relevancia industrial: (i) producción de 9OH-AD a partir de esteroides, (ii) producción de testosterona y, (iii) Δ 1,2-deshidrogenación y 9 α -hidroxilación de 3-cetoesteroides. En los tres ejemplos se contextualizará la importancia industrial del proceso, se explicará la hipótesis de trabajo seguida y se mostrarán los resultados obtenidos. En este sentido, resulta relevante subrayar que las aproximaciones aquí descritas son pruebas de concepto que pretenden demostrar la utilidad de incorporar nuevos conceptos y/o herramientas (p. ej., tecnología de ADN recombinante) en los procesos biotecnológicos para la producción de esteroides y en ningún caso, el objetivo perseguido en este estudio ha sido la optimización de los mismos.

2.1. Producción de 9OH-AD a partir de esteroides

Los intermediarios AD, ADD y 9OH-AD despiertan gran interés en la industria farmacéutica, ya que son utilizados como moléculas de partida en la síntesis química de algunos fármacos esteroideos (p. ej., corticoesteroides). Estos intermediarios son actualmente producidos mediante procesos de biotransformación microbiana a partir de esteroides, utilizando cepas de *Mycobacterium* aisladas de muestras ambientales y seleccionadas después de varias rondas de mutagénesis convencional. Sin embargo, una nueva tendencia ha aparecido en los últimos años, que consiste en el diseño racional de cepas productoras siguiendo aproximaciones de Ingeniería Metabólica (Ver Apartado. 2.2.1, Introducción). Dado que se ha postulado que los compuestos AD, ADD y 9OH-AD son intermediarios de la ruta catabólica de esteroides en diversas actinobacterias (García *et al.*, 2012), resulta sencillo redireccionar el flujo metabólico hacia la acumulación/síntesis de estos compuestos (Fig. 38). Por tanto, la estrategia a seguir para diseñar un organismo productor de ADD, consiste en inactivar la actividad 9 α -hidroxilasa (Ksh) de la bacteria en presencia de esteroides. Por el contrario, para obtener una cepa productora de 9OH-AD es necesario inactivar la actividad 3-cetosteroides- Δ^1 -deshidrogenasa (KstD) en presencia de esteroides. Por último, para la obtención de cepas productoras de AD es necesaria la inactivación de ambas actividades enzimáticas.

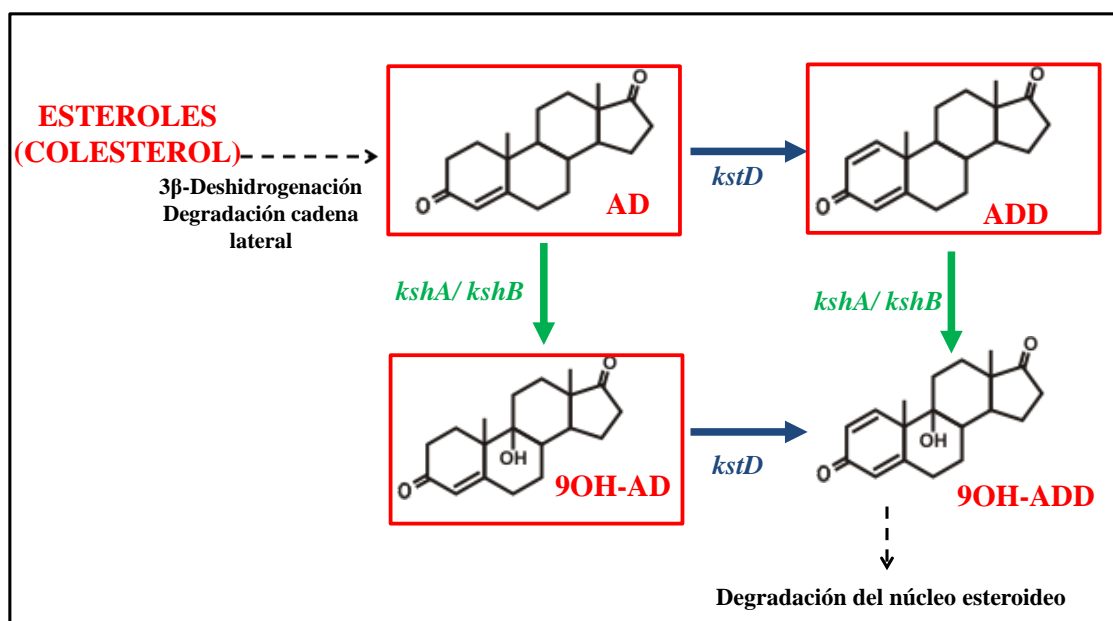


Figura 38. Esquema simplificado de la ruta catabólica de esteroides propuesta en actinobacterias. Las enzimas 3-cetoesteroides- Δ^1 -deshidrogenasas (KstD) y 9 α -hidroxilasas (Ksh) juegan un papel clave en la degradación del núcleo esteroideo. Las enzimas KSH constan de un componente oxigenasa (KshA) y un componente reductasa (KshB). La inactivación de las actividades enzimáticas KstD, KSH o ambas, permite la acumulación a partir de esteroides de 9OH-AD, ADD o AD, respectivamente.

A la vista del conocimiento de las rutas de degradación de esteroides en *M. smegmatis* mc²155 (García *et al.*, 2012), en nuestro laboratorio se propuso la utilización de esta bacteria como modelo para la producción de intermediarios esteroideos C-19 a partir de esteroides. Este trabajo se encuentra disponible en este apartado (producción de 9OH-AD) y en la publicación de Galán *et al.* (2017) (producción de AD y ADD).

2.1.1. Hipótesis de trabajo: identificación *in silico* de las enzimas KSH y KstD de *M. smegmatis* mc²155

La identificación *in silico* de los genes que codifican las enzimas KSH (KshA y KshB) y KstD del catabolismo del colesterol en *M. smegmatis* mc²155 se efectuó en dos etapas. En primer lugar, utilizando como referencia la secuencia proteica de las enzimas KSH y KstD involucradas en el catabolismo de esteroides en *R. jostii* (van der Geize *et al.*, 2007) y *M. tuberculosis* (Knol *et al.*, 2008; Capyk *et al.*, 2009b), se buscaron enzimas homólogas en *M. smegmatis*. A continuación, usando los datos de *microarrays* previamente publicados en *M. smegmatis* (Kendall *et al.*, 2007; Uhía *et al.*, 2012), se analizó la inducción de los genes que codifican estas enzimas potencialmente candidatas en presencia de colesterol. Por último, en las secuencias promotoras estos genes candidatos se analizó la presencia de secuencias operadoras consenso de unión del represor KstR (Kendall *et al.*, 2007)

Generalmente, las enzimas monooxigenasas que constan de varios componentes (dos o tres) (p.ej., KSH) suelen estar codificadas por genes organizados en un único operón. Sin embargo, se ha observado que los genes *kshA* y *kshB* que codifican la actividad KSH en *R. jostii* (van der Geize *et al.*, 2002a) o en *M. tuberculosis* (Cole *et al.*, 1998) no se localizan próximos en el genoma. Utilizando las secuencias nucleotídicas de los genes *kshA* y *kshB* anotados de *R. jostii* (van der Geize *et al.*, 2007) y *M. tuberculosis* (Capyk *et al.*, 2009b), se localizaron los genes homólogos correspondientes en *M. smegmatis* (Tabla 12). Este análisis reveló la existencia de al menos dos genes que codifican posibles componentes oxigenasas KshA, (*kshA1* y *kshA2*) y, dos genes que codifican posibles componentes reductasa (*kshB1* y *kshB2*). Por tanto, teóricamente *M. smegmatis* podría producir cuatro tipos diferentes de KSH hidroxilasas: KSH1 (KshA1B1), KSH2 (KshA2B2), KSH3 (KshA1B2), KSH4 (KshA2B1). Sin embargo, al realizar un análisis más detallado de las secuencias promotoras de estos genes, se observó que sólo MSMEG_5925 (*kshA1*) y MSMEG_6039 (*kshB1*) presentaban la secuencia operadora consenso de unión del represor KstR que regula el catabolismo del colesterol (Kendall *et al.*, 2007). Además, los experimentos de expresión con *microarrays* llevados a cabo en *M. smegmatis* indicaron que *kshA1* y *kshB1* se inducían 1,9 y 7,0 veces en colesterol respecto a glicerol, respectivamente (Uhía *et al.*, 2012). Estos resultados indicaban que probablemente sólo *kshA1* y *kshB1* estaban involucrados en el metabolismo de colesterol en *M. smegmatis*.

Por otra parte, se identificó *in silico* cinco genes *kstD* en el genoma de *M. smegmatis* (MSMEG_5941, MSMEG_2869, MSMEG_2867, MSMEG_4864, MSMEG_4870) (Tabla 12), aunque sólo la región promotora del gen MSMEG_5941 (*kstD1*) presentaba la secuencia operadora consenso de KstR y era expresado diferencialmente en presencia de colesterol (Uhía *et al.*, 2012). Estos resultados apoyaban la hipótesis de que probablemente sólo el gen *kstD1* estaba involucrado en el catabolismo del colesterol.

Sobre la base de estos análisis *in silico*, se postuló que la delección de los genes *kshB1* y/o *kstD1* en *M. smegmatis*, era suficiente para generar mutantes capaces de acumular AD, ADD o 9OH-AD a partir de esteroides. La información relativa a la construcción de los mutantes MS6039 (Δ MSMEG_6039, Δ ksh1B) y MS5941-6039 (Δ MSMEG_5941 Δ MSMEG_6039, Δ kstD1 Δ kshB1) productores de ADD y AD, respectivamente, se ha mencionado en la Introducción y se puede encontrar con más detalle en Galán *et al.* (2017). A continuación, se detallará la construcción del mutante MS5941 (Δ MSMEG_5941, Δ kstD1) diseñado para la producción de 9OH-AD a partir de esteroides.

2.1.2. Producción de 9OH-AD en biotransformaciones en crecimiento

De acuerdo a los análisis genómicos previos, la eliminación de la actividad enzimática KstD1 debería permitir la acumulación de 9OH-AD a partir de esteroides en *M. smegmatis* mc²155. Para verificar esta hipótesis, se construyó el mutante MS5941 ($\Delta kstD1$) utilizando el vector suicida pJQ5941 previamente elaborado por Galán *et al.* (2017). La cepa mutante MS5941, a diferencia de la cepa parental mc²155, no fue capaz de crecer eficientemente en esteroides cuando fueron utilizados como única fuente de carbono y energía, pero presentaba un crecimiento normal en otras fuentes de carbono (p. ej., glicerol) (Fig. 39). Este comportamiento fue previamente observado en las cepas mutantes MS6039 y MS6039-5941 (Galán *et al.*, 2017).

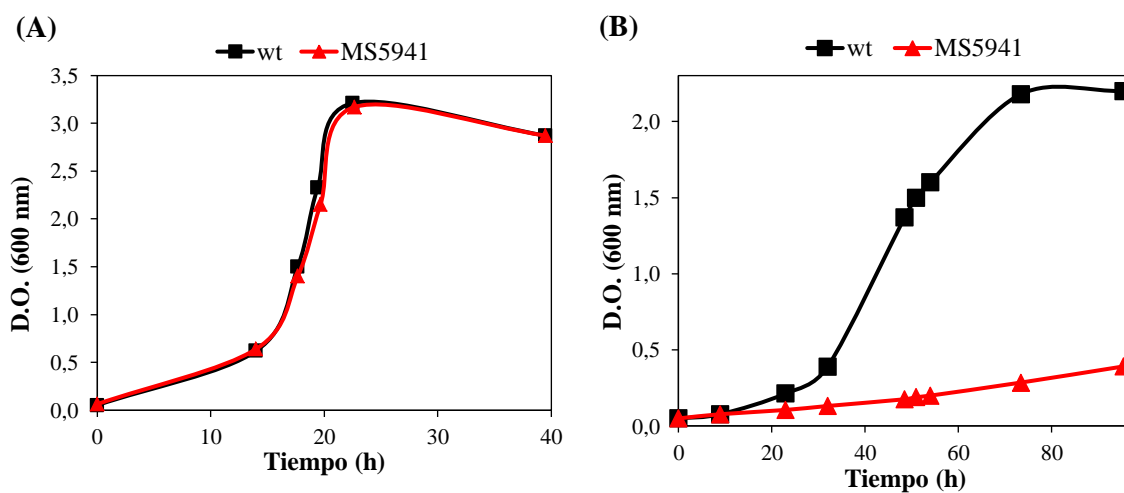


Figura 39. Curvas de crecimiento de *M. smegmatis* mc²155 (negro) y *M. smegmatis* MS5941 (rojo) en diferentes sustratos. Las cepas se cultivaron en medio mínimo 7H9 con glicerol 18 mM (A) o colesterol 1,8 mM (B) como única fuente de carbono y energía.

Por otra parte, el crecimiento leve observado en la cepa MS5941 en presencia de esteroides indicaba que probablemente esta cepa sólo era capaz de degradar la cadena lateral del esteroide y que se estaban acumulando intermediarios en el medio de cultivo. Para confirmar este hecho, se extrajo con cloroformo una alícuota del cultivo y se analizó la presencia de intermediarios esteroideos mediante métodos cromatográficos (HPLC). En este caso, se añadió glicerol 18 mM como fuente de carbono y energía alternativa para favorecer la generación de biomasa y por tanto, la conversión de esteroides (colesterol 1,8 mM). Mientras que la cepa parental mineralizó completamente el colesterol y no se detectó la presencia de intermediarios (datos no mostrados), el mutante MS5941 acumuló 9OH-AD con una conversión molar del 81% (calculada en base al colesterol añadido) (Fig. 40A). En el medio de cultivo también se detectó la presencia de pequeñas cantidades de AD y de otros intermediarios desconocidos (Fig. 40B).

Por último, para confirmar que la delección de *kstD1* es la única mutación responsable del fenotipo observado, el mutante MS5941 fue complementado *en trans* con una copia original del gen *MSMEG_5941*. Para ello, este gen fue clonado en el plásmido pMV261 generando el plásmido pMV5941 que se transformó en la cepa MS5941. En la Figura 41, se observa cómo la cepa recombinante *M. smegmatis* MS5941 (pMV5941) recuperó la capacidad de utilizar esteroides como única fuente de carbono y energía.

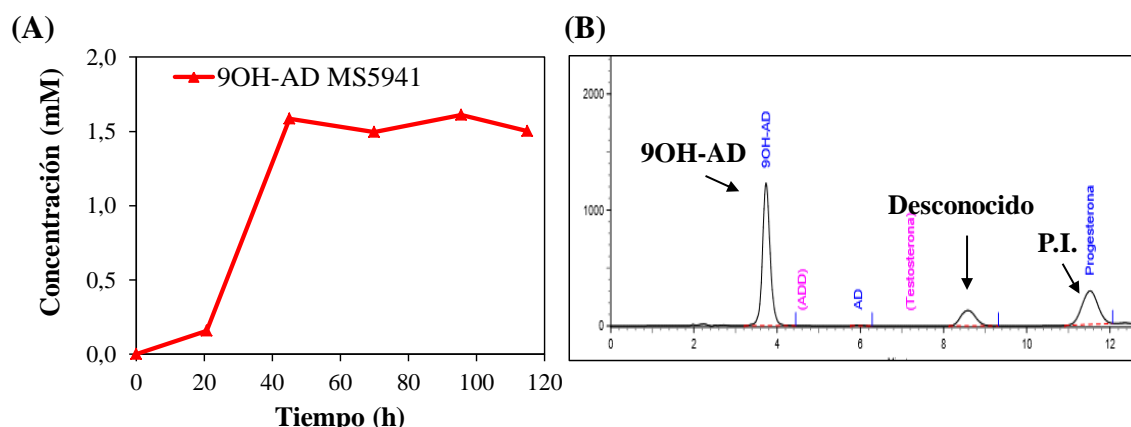


Figura 40. Producción de 9OH-AD a partir de colesterol por la cepa MS5941. El mutante fue cultivado en medio mínimo 7H9 con colesterol 1,8 mM (sustrato) y glicerol 18 mM (fuente de carbono y energía). **(A)** Producción de 9OH-AD durante la fermentación. **(B)** Cromatograma de HPLC. Acumulación de 9OH-AD y pequeñas cantidades de AD al final de la biotransformación. La producción de un intermediario desconocido fue también detectada. El esteroide progesterona fue utilizado como patrón interno de extracción (P.I.).

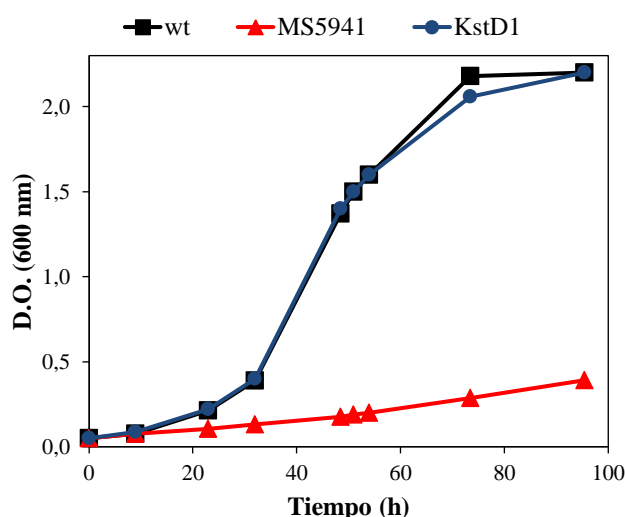


Figura 41. Ensayo de complementación en *trans* del mutante MS5941. Curvas de crecimiento de diversas cepas de *M. smegmatis* cultivadas en medio mínimo 7H9 con colesterol 1,8 mM como única fuente de carbono y energía. Cepas utilizadas: mc²155 (pMV261) [wt, negro], MS5941 (pMV261) [MS5941, rojo], MS5941 (pMV5941) [KstD1, azul].

Estos resultados confirmaron que la enzima KstD1 codificada por el gen *MSMEG_5941* es la única enzima KstD involucrada en el catabolismo de esteroides en *M. smegmatis*, o al menos la enzima más relevante en el proceso, a pesar de la existencia de otros genes *kstD* anotados en el genoma. Por tanto, se puede concluir que no hay presentes en la célula cantidades significativas de otras KstDs que puedan reemplazar de manera eficaz la actividad de KstD1 para degradar colesterol (al menos en las condiciones de cultivo ensayadas).

2.2. Producción de testosterona

En el apartado anterior se ha demostrado que es posible diseñar racionalmente cepas de *M. smegmatis* productoras de intermediarios esteroideos (p. ej., AD, ADD o 9OH-AD) a partir de esteroides, siguiendo aproximaciones de Ingeniería Metabólica. Manipulando las rutas endógenas del catabolismo de esteroides se ha logrado canalizar el flujo metabólico hacia la formación de un producto de interés (p. ej., 9OH-AD). A continuación, esta estrategia será combinada con la introducción de actividades enzimáticas heterólogas que permitan redirigir el flujo metabólico hacia la formación de nuevos productos que no forman parte del metabolismo celular. El compuesto AD producido a partir de esteroides será redirigido hacia la síntesis de testosterona (TS) mediante la introducción de una actividad 17 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa (17 β -HSD) heteróloga en *M. smegmatis* (Fig. 42).

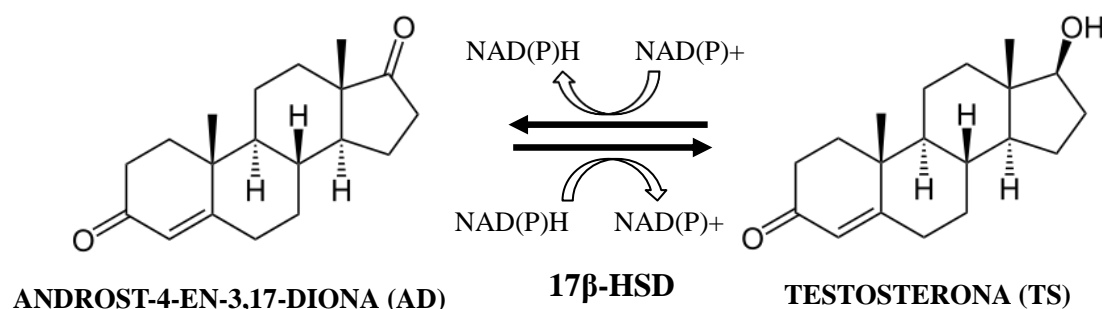


Figura 42. Representación esquemática de la transformación de androst-4-ene-3,17-diona (AD) en testosterona (TS) catalizada por enzimas 17 β -HSD.

2.2.1. Hipótesis de trabajo

La TS es una hormona sexual esteroidea del grupo de los andrógenos, que promueve efectos fisiológicos androgénicos y anabolizantes y es sintetizada por la mayoría de los vertebrados. En mamíferos, la síntesis de TS a partir de AD es catalizada por la enzima microsomal 17-cetoesteroide reductasa (17 β -HSD; 17 β -hidroxiesteroide:NADP 17-oxidoreductasa, EC 1.1.1.64) (Bogovich y Payne, 1980) (Fig. 42). Hasta el momento, se han identificado catorce subtipos diferentes de 17 β -HSD en mamíferos que pertenecen en su mayoría a la superfamilia de deshidrogenasas SDR (*Short-chain dehydrogenase:reductase superfamily*). Estas proteínas catalizan reducciones/oxidaciones dependientes de NAD(P)H/NAD(P)⁺ en la posición C-17 de diversos esteroides (Peltoketo *et al.*, 1999; Moeller y Adamski, 2006, 2009; Marchais-Oberwinkler *et al.*, 2011) y pueden llevar a cabo reacciones reversas en condiciones *in vitro* (Fig. 42). La reducción enzimática de AD a TS por 17 β -HSDs también ha sido descrita en otros organismos, pero en la mayoría de los casos no se conoce con certeza la verdadera función biológica de estas proteínas (Donova *et al.*, 2005c).

En las últimas décadas se han publicado varios ejemplos de producción de TS por fermentación microbiana utilizando micobacterias aisladas del medio ambiente u obtenidas por métodos de mutagénesis clásica (Wang *et al.*, 1982; Hung *et al.*, 1994; Liu *et al.*, 1994; Llanes *et al.*, 1995; Liu y Lo, 1997; Borrego *et al.*, 2000; Lo *et al.*, 2002; Mei *et al.*, 2005; Egorova *et al.*, 2009) (Tabla 3). Sin embargo, al inicio de esta Tesis Doctoral, no se encontró ningún ejemplo de bacteria modificada genéticamente

para producir TS a partir de AD o esteroides. Varias enzimas 17 β -HSD han sido clonadas y caracterizadas (Abalain *et al.*, 1993; Rižner *et al.*, 1999; Chang *et al.*, 2010), pero ninguna ha sido utilizada para diseñar bacterias modificadas genéticamente para mejorar la producción biotecnológica de TS. Estos genes han sido sólo expresados en *E. coli*, una bacteria incapaz de transportar eficientemente esteroides o AD, lo que ha imposibilitado el desarrollo de un proceso de biotransformación industrial.

2.2.1.1. Selección de *M. smegmatis* como biofactoría celular para la producción de TS

En este trabajo se seleccionó la bacteria *M. smegmatis* como biofactoría celular para la producción de TS por múltiples causas. En primer lugar, esta micobacteria es capaz de transportar y metabolizar esteroides (p. ej., colesterol y fitoesteroides) y existe un mutante disponible para la producción de AD a partir de esteroides (Galán *et al.*, 2017). En segundo lugar, esta bacteria presenta dos propiedades fundamentales para la producción de TS: transporta esteroides C-19 (p. ej., AD y TS) y no metaboliza estos compuestos. Otras bacterias que son capaces de transportar AD y TS, como por ejemplo representantes de los géneros *Comamonas*, *Rhodococcus* o *Gordonia*, en principio no podrían ser utilizadas porque metabolizan eficientemente estos compuestos (Tamaoka *et al.*, 1987; Cabrera *et al.*, 2000; Fernández de las Heras *et al.*, 2009; Li *et al.*, 2014). La utilización de *M. smegmatis* ofrece la ventaja de no ser necesario evadir la mineralización de AD y TS durante la biotransformación.

Por otra parte, a diferencia de lo descrito en otras especies de micobacterias (Wang *et al.*, 1982; Smith *et al.*, 1993; Egorova *et al.*, 2002a), cuando se cultivó *M. smegmatis* mc²155 o la cepa mutante productora de AD en presencia de fitoesteroides o colesterol, no se detectó TS como intermediario metabólico (Galán *et al.*, 2017). Esta observación sugería que *M. smegmatis* mc²155 no presenta un gen que codifica una 17 β -HSD funcional o al menos, este gen no se induce en presencia de estos compuestos. Por ello, resultó necesario identificar y seleccionar genes de 17 β -HSDs para expresarlos de manera heteróloga en *M. smegmatis*.

2.2.1.2. Búsqueda de enzimas 17 β -HSD candidatas de origen microbiano

En el apartado anterior se mencionó que se han descrito actividades 17 β -HSD en distintas especies de micobacterias. Sin embargo, sólo en algunos casos se han purificado parcialmente las proteínas y en ningún caso ha sido posible la identificación de los genes que codifican las 17 β -HSDs (Goren *et al.*, 1983; Egorova *et al.*, 2002b, 2005). Recientemente se ha descrito que la proteína Hsd4A de *M. neoaurum* ATCC 25795 presenta tanto actividad 17 β -HSD como β -hidroxiacil-CoA deshidrogenasa en ensayos *in vitro*. La actividad 17 β -HSD de esta proteína parece no ser reversible, ya que únicamente es capaz de transformar TS en AD y por tanto, no podría ser utilizada para nuestro propósito de producción de TS (Xu *et al.*, 2016). Por este motivo, se decidió buscar otras 17 β -HSDs microbianas que hubieran sido previamente caracterizadas.

En primer lugar, se eligieron las enzimas 17 β -HSDs de la bacteria *C. testosteroni* (Schultz *et al.*, 1977; Lefebvre *et al.*, 1979; Minard *et al.*, 1985; Genti-Raimondi *et al.*, 1991; Yin *et al.*, 1991; Abalain *et al.*, 1993; Benach *et al.*, 1996; Oppermann *et al.*, 1997; Cabrera *et al.*, 2000; Benach *et al.*, 2002) y del hongo *C. lunatus* (Plemenitas *et al.*, 1988; Rižner *et al.*, 1996, 1999, 2000; Rižner y Zakelj-Mavric, 2000; Zorko *et al.*

al., 2000; Rižner *et al.*, 2001a, b; Kristan *et al.*, 2003, 2005; Cassetta *et al.*, 2005; Ulrih y Rižner, 2006; Kristan *et al.*, 2007a, b; Brunskole *et al.*, 2009; Svegelj *et al.*, 2012), porque son probablemente las 17 β -HSDs más estudiadas y además presentan algunas diferencias relevantes entre ellas. Ambas enzimas son reversibles y tienen mecanismos de reacción similares, pero presentan propiedades catalíticas diferentes. La enzima fúngica presenta un equilibrio de reacción más desplazado hacia la reducción mientras que en el caso de la proteína bacteriana está más desplazado hacia la oxidación, ya que esta última interviene en el catabolismo de la TS en *C. testosteroni* (Genti-Raimondi *et al.*, 1999; Cabrera *et al.*, 2000). La enzima fúngica utiliza NADPH como coenzima para la reducción de AD, mientras que no presenta preferencias entre NAD⁺/NADP⁺ para la oxidación de TS (Rižner y Zakelj-Mavric, 2000). Por su parte, la proteína bacteriana utiliza NAD(H) como cofactor y es una enzima bifuncional con un único centro activo que puede acomodar actividades 3 β -HSD y/o 17 β -HSD (Minard *et al.*, 1985; Benach *et al.*, 2002). Todos estos aspectos son relevantes y deben ser considerados a la hora de desarrollar procesos biotecnológicos, puesto que el contenido intracelular de cofactores (tipo y ratio de cofactor oxidado/reducido) puede determinar la dirección de la reacción catalítica y por tanto, el rendimiento del proceso.

A continuación, con el objetivo de identificar nuevas 17 β -HSD de origen microbiano como alternativas a las proteínas arriba mencionadas, se realizaron diversos análisis *in silico*. En primer lugar, se realizaron búsquedas BLASTp utilizando como referencia la 17 β -HSD de *C. testosteroni*. En este caso, en las bases de datos se identificaron proteínas de varias especies micobacterianas que presentaban una identidad de secuencia baja (menor del 40%). En el genoma de *M. smegmatis* mc²155, se encontraron varias posibles proteínas homólogas pertenecientes a la familia de las deshidrogenasas SDR, como por ejemplo la proteína 3- α -(or 20- β)-hidroxiesteroide deshidrogenasa (*MSMEG_3515*, 38% identidad) y la ciclopentanol deshidrogenasa (*MSMEG_6709*, 37% identidad). Sin embargo, al analizar su contexto genómico, no se encontraron genes que parezcan estar relacionados con el catabolismo de esteroides. En segundo lugar, se realizó una búsqueda BLASTp utilizando como referencia la 17 β -HSD de *C. lunatus*. Esta enzima presenta una gran identidad de secuencia (60-95%) con otras proteínas presentes en el grupo de hongos Leotiomycetes que pertenece al filo Ascomycota. Sin embargo, resulta curioso que otros representantes de este filo en los que se han descrito actividades 17 β -HSDs (p.ej., *Saccharomyces cerevisiae*) no presenten proteínas con identidades de secuencia significativas (Ward y Young, 1990; Długoński y Wilmańska, 1998). Fuera del grupo Leotiomycetes, se identificaron bacterias de diferentes filos que presentan proteínas con identidades del 42-48% (cianobacterias, diferentes grupos de proteobacterias, firmicutes, etc.), entre las que se incluyen diversas actinobacterias (p. ej., *Mycobacterium abscessus*, *Rhodococcus wratislaviensis* NBRC 100605 y varias especies del género *Streptomyces*). En el genoma de *M. smegmatis* sólo se identificaron proteínas con una identidad igual o inferior al 36%.

Finalmente, ante la dificultad de establecer una correlación directa entre identidad de secuencia y actividad 17 β -HSD mediante análisis *in silico*, se seleccionaron los genes de 17 β -HSD de *C. testosteroni* y *C. lunatus* para la expresión heteróloga en *M. smegmatis*. Hay que señalar que la baja identidad de secuencia ya había sido descrita en los vertebrados que presentan múltiples isoenzimas 17 β -HSDs con identidades de secuencias bajas (15-20%) (Moeller y Adamski, 2009).

2.2.1.3. Esquema de la trabajo para la producción de TS en *M. smegmatis*

El objetivo de nuestro trabajo fue diseñar bacterias recombinantes capaces de biotransformar esteroides naturales (fitoesteroides o colesterol) y/o androst-4-en-3,17-diona (AD) en testosterona (TS), con

el objetivo último de implementar un proceso biotecnológico que pueda competir con la síntesis química de TS establecida actualmente a escala industrial. Para ello, se clonaron y sobreexpresaron los genes de 17 β -HSD obtenidos de la bacteria *C. testosteronei* (Abalain *et al.*, 1993) y del hongo *C. lunatus* (Rižner *et al.*, 1999) en la cepa silvestre de *M. smegmatis* y una cepa mutante MS6039-5941 ($\Delta kshB1 \Delta kstD1$) productora de AD (Tabla 7).

En primer lugar, para la clonación del gen de la 3 β /17 β -HSD de *C. testosteronei* (Abalain *et al.*, 1993), se amplificó su secuencia génica por PCR usando los oligonucleótidos HDHF y HDHR como cebadores (Tabla 9) y ADN genómico de *C. testosteronei* ATCC 11996 como molde. Se generó una versión modificada de la proteína con una cola de histidinas en el N-terminal, mediante la introducción de una secuencia codificando seis histidinas en el oligonucleótido HDHF. El producto de PCR se clonó en el vector pMV261 generando el plásmido pHSDCT. En segundo lugar, para la clonación del gen de la 17 β -HSD de *C. lunatus* (Rižner *et al.*, 1999), se optimizó el uso de codón de la secuencia génica para su expresión en *Mycobacterium* (Secuencia génica en Anexo I) y se sintetizó químicamente (ATG:biosynthetics GmbH, Germany) (ver Apartado 4.7. Materiales y Métodos). El gen sintético fue clonado en el vector pMV261 generando el plásmido pHSDCL. Los plásmidos pHSDCT y pHSDCL fueron transformados en las cepas *M. smegmatis* mc²155 y *M. smegmatis* MS6039-5941, generando cuatro cepas recombinantes: *M. smegmatis* mc²155 (pHSDCT), *M. smegmatis* mc²155 (pHSDCL), *M. smegmatis* MS6039-5941 (pHSDCT) and *M. smegmatis* MS6039-5941 (pHSDCL). A continuación, se investigó la capacidad de producir TS de las nuevas cepas recombinantes en biotransformaciones en crecimiento o en *resting-cell* utilizando esteroides o AD como sustratos, respectivamente (Fig. 43).

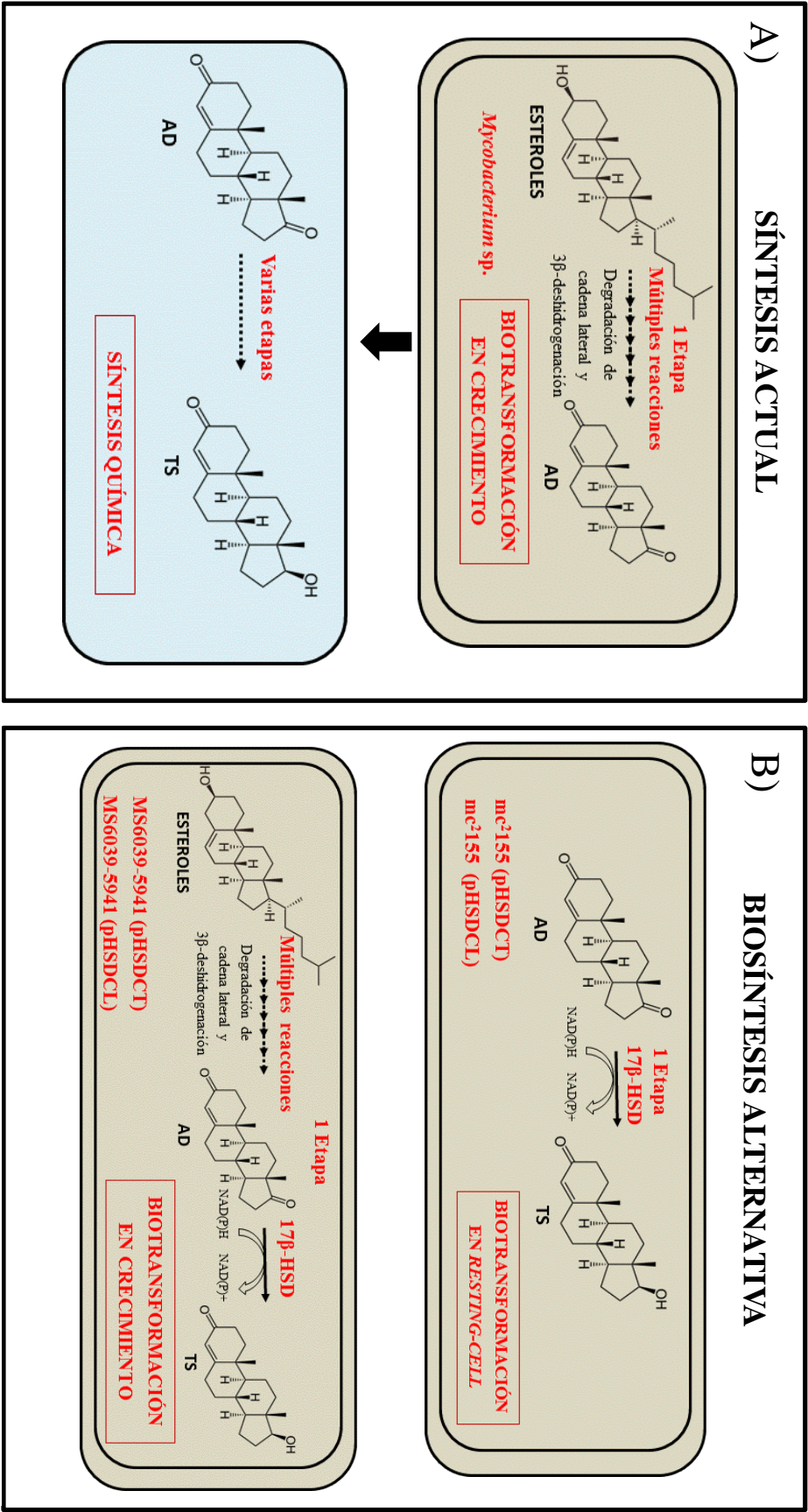


Figura 43. Representación esquemática de procesos alternativos para la síntesis de testosterona. A) Producción actual de TS en la industria farmacéutica combinando etapas biológicas y químicas. El intermediario AD, previamente producido a partir de esteroides mediante fermentación microbiana, es transformado a TS en un proceso químico que consta varias etapas. B) Producción biotecnológica de TS propuesta en este trabajo. El intermediario AD es transformado a TS en una biotransformación en *resting-cell* con las cepas *M. smegmatis* mc²155 (pHSDCT) o *M. smegmatis* mc²155 (pHSDCL). Alternativamente, la producción directa de TS a partir de esteroides puede ser llevada a cabo en biotransformaciones en crecimiento con las cepas mutantes *M. smegmatis* MS60369-5941 (pHSDCT) o *M. smegmatis* MS60369-5941 (pHSDCL).

2.2.2. Producción de TS en biotransformaciones en *resting-cell*

La producción de TS a partir AD fue analizada en las cepas recombinantes *M. smegmatis* mc²155 (pHSDCT) y *M. smegmatis* mc²155 (pHSDCL) en biotransformaciones en *resting-cell* (Ver Apartado 9.3. de Materiales y Métodos). En las condiciones de reacción estándar, es decir, cuando las células recombinantes se resuspendieron en una solución tamponada que contenía únicamente el sustrato AD 2 mM, apenas se observó formación de producto (Fig. 44). Sin embargo, cuando se añadió glucosa 1% (p/V) al medio de reacción, se detectó una transformación eficiente de AD en TS en ambas cepas recombinantes (Fig. 44). Cuando se adicionó glicerol 1% (p/V) en lugar de glucosa, se obtuvieron también conversiones notables pero con rendimientos ligeramente más bajos a los previamente observados (Fig. 44). Estos resultados apoyan la hipótesis de que el nivel intracelular de NAD(P)/NAD(P)H es diferente en presencia de glucosa o glicerol, siendo este aspecto crítico para la biotransformación. En este sentido, diversos autores ya han demostrado que factores tales como la adición de fuentes de carbono y el pH de la reacción son importantes para la producción de TS, ya que determinan la dirección del equilibrio de reacción (Liu *et al.*, 1994; Llanes *et al.*, 1995; Liu *et al.*, 1997; Egorova *et al.*, 2009).

También resulta importante señalar que las cepas *M. smegmatis* MS6039-5941 (pHSDCT) y *M. smegmatis* MS6039-5941 (pHSDCL) se comportaron de manera similar en estos ensayos de biotransformación (datos no mostrados). El uso de estos mutantes no ofrece ninguna ventaja en este ensayo, porque *M. smegmatis* mc²155 no es capaz de metabolizar el AD.

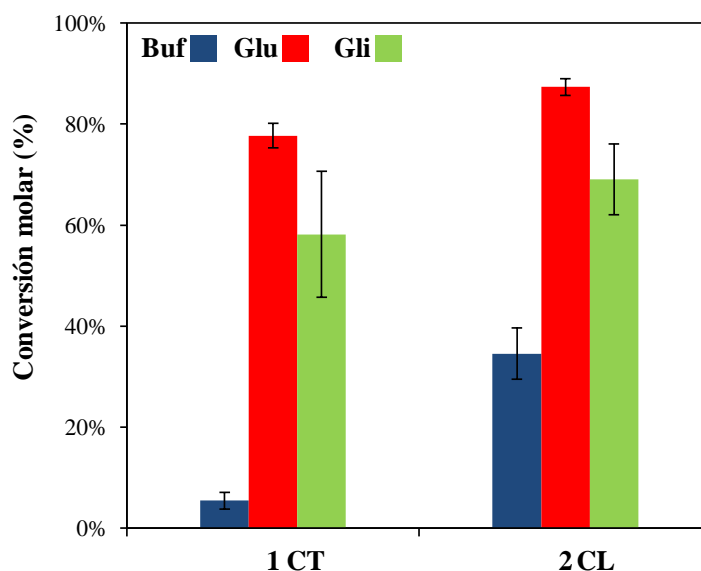


Figura 44. Producción de testosterona en biotransformaciones en *resting-cell* por *M. smegmatis*. Se representa la conversión de AD en TS por las cepas recombinantes *M. smegmatis* mc²155 (pHSDCT) (1, CT) y *M. smegmatis* mc²155 (pHSDCL) (2, CL) en tres condiciones de reacción: estándar (sin adición de fuentes de carbono) (Buf, azul), con adición de glucosa 1% (Glu, rojo) y con adición de glicerol 1% (Gli, verde). Las conversiones molares de TS se calcularon en base a las concentraciones de AD y TS medidas en el medio de reacción a las 24 h de biotransformación. Se muestra la conversión media y la desviación estándar de dos réplicas biológicas independientes.

2.2.3. Producción de TS en biotransformaciones en crecimiento

La producción de TS a partir de esteroides fue investigada en las cepas recombinantes *M. smegmatis* MS6039-5941 (pHSDCT) y *M. smegmatis* MS6039-5941 (pHSDCL) en biotransformaciones en crecimiento (Ver Apartado 9.4. de Materiales y Métodos). Las cepas fueron cultivadas en medio mínimo con colesterol 1,8 mM (sustrato) y glicerol 18 mM (fuente de carbono y energía principal). En estas condiciones de ensayo, las dos cepas recombinantes transformaron la totalidad del colesterol en AD y sólo se detectaron pequeñas cantidades de TS durante la fase de crecimiento exponencial de los cultivos (Fig. 45). Cuando se repitió el ensayo utilizando glucosa 9 mM en lugar de glicerol 18 mM como fuente de carbono y energía, se obtuvieron resultados similares (datos no mostrados). Es importante mencionar que en estas condiciones de cultivo sólo se observó crecimiento microbiano (incremento en la D.O.₆₀₀) en las primeras 24 h de cultivo debido al consumo de glicerol o glucosa. Después de este tiempo, el colesterol siguió siendo transformado en AD, pero la degradación de la cadena lateral del colesterol no suministró suficiente energía y/o carbono para promover la generación de biomasa (Fig. 45). Teniendo en cuenta que los resultados de las biotransformaciones en *resting-cell* señalaban que la reducción de AD en TS no es eficiente en condiciones limitantes de energía, podría ser necesaria la adición de una fuente de carbono alternativa para la activación del metabolismo celular y la producción eficiente de testosterona.

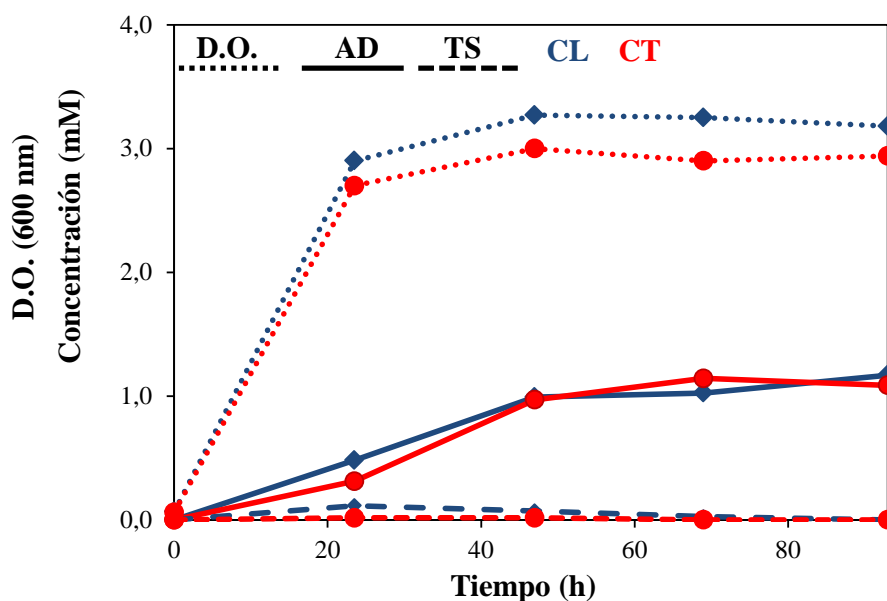


Figura 45. Producción de testosterona en biotransformaciones en crecimiento por *M. smegmatis*. Las cepas recombinantes *M. smegmatis* MS6039-5941 (pHSDCT) (CT, rojo) y *M. smegmatis* MS6039-5941 (pHSDCL) (CL, azul) fueron crecidas en medio mínimo 7H9 con glicerol 18 mM (fuente de carbono y energía) y colesterol 1,8 mM (sustrato). Las concentraciones de AD (líneas continuas) y TS (líneas discontinuas) fueron medidas a lo largo del proceso de fermentación y el crecimiento microbiano fue monitorizado con la densidad óptica (D.O.₆₀₀, línea de puntos).

A continuación, se simuló una pseudo-transformación en *resting-cell* llevando a cabo dos etapas de biotransformación consecutivas en el mismo matraz. La primera etapa se realizó en presencia de glicerol 18 mM y colesterol 1,8 mM. En estas condiciones, se había observado que las cepas recombinantes derivadas de MS6039-5941 transformaban casi la totalidad del colesterol en AD en las primeras 69 h de cultivo (Fig. 45). Por ello, en ese momento, en una segunda etapa, se adicionó glucosa o glicerol 1% (p/V) y se analizó la producción de TS a las 24 h como se había hecho previamente en los ensayos en *resting-cell*. Usando esta aproximación, las dos cepas recombinantes transformaron el

colesterol en TS más eficientemente, pero se observaron diferencias significativas entre ambas cepas probablemente debido a las diferencias cinéticas de las enzimas 17β -HSD heterólogas que producen (Fig. 46A). En presencia de glucosa 1%, las conversiones medias de TS/androstano (AD y TS) de las cepas MS6039-5941 (pHSDCL) y MS6039-5941 (pHSDCT) fueron 77,6% y 28,6%, respectivamente. Cuando se utilizó glucosa 9 mM en la primera etapa (en lugar de glicerol 18 mM) y se adicionó glucosa 1% a las 69 h de cultivo se obtuvieron resultados similares (datos no mostrados). En cambio, la producción de TS fue ligeramente más baja cuando se adicionó glicerol 1% en lugar de glucosa en ambas cepas (Fig. 46B).

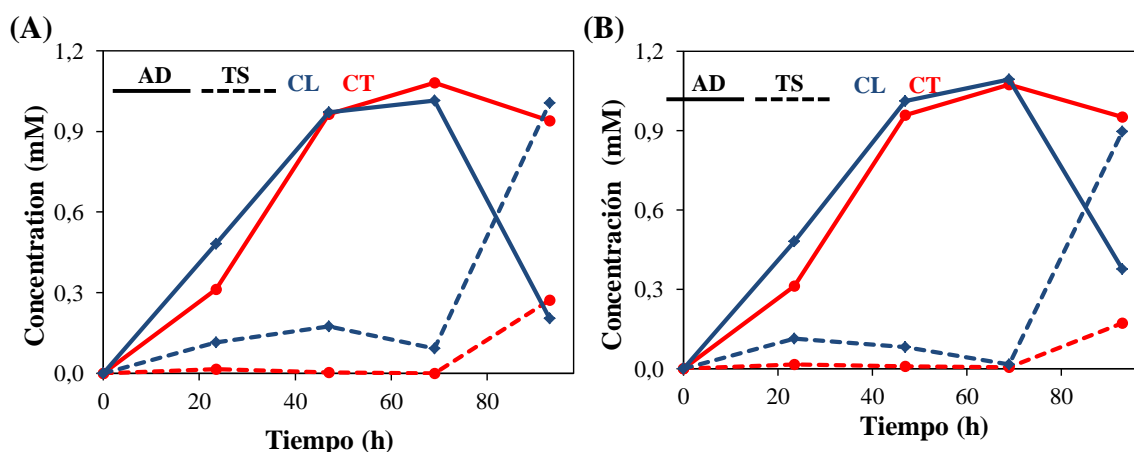


Figura 46. Producción de TS en pseudo-biotransformaciones en *resting-cell* por *M. smegmatis*. Las cepas recombinantes *M. smegmatis* MS6039-5941 (pHSDCT) (CT, rojo) y *M. smegmatis* MS6039-5941 (pHSDCL) (CL, azul) fueron crecidas en medio mínimo 7H9 con glicerol 18 mM (fuente de carbono y energía) y colesterol 1,8 mM (sustrato) con una adición de glucosa (A) o glicerol 1% (B) a las 69 h de cultivo. Las concentraciones de AD (líneas continuas) y TS (líneas discontinuas) fueron medidas a lo largo del proceso de fermentación.

Con el objetivo de estudiar la influencia del estado metabólico celular en la producción de TS, se ensayaron nuevas condiciones de cultivo. En primer lugar, se estudió el efecto de la adición de glucosa 1% en una etapa tardía de la fase de crecimiento exponencial (23,5 h) (Fig. 47A). En segundo lugar, se ensayó el efecto de añadir concentraciones mayores de fuente de carbono desde el comienzo de la fermentación, es decir, se adicionó glucosa 1% (55,5 mM) en lugar de glicerol 18 mM (Fig. 47B). En ambas condiciones, las dos cepas recombinantes produjeron TS pero presentaron comportamientos diferentes. La cepa MS6039-5941 (pHSDCL) presentó rendimientos más altos de TS y una reversión no significativa de la reacción de TS a AD. Sin embargo, en la cepa MS6039-5941 (pHSDCT) se observó una reconversión notable de TS en AD después de las 47 h de fermentación. La reversibilidad de este tipo de enzimas ya ha sido previamente descrita en otros mutantes de micobacterias productores de TS a partir de colesterol (Liu y Lo, 1997).

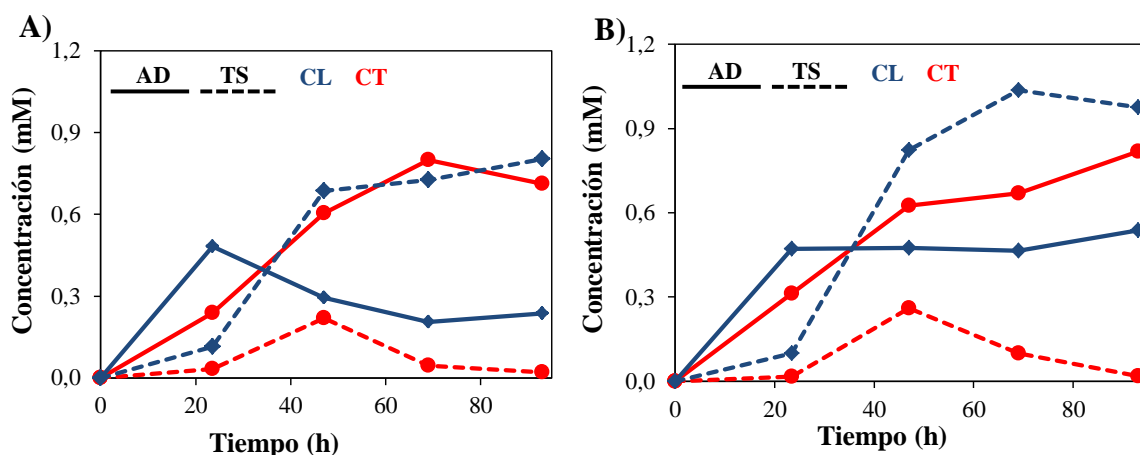


Figura 47. Producción de TS en biotransformaciones en crecimiento por *M. smegmatis*. Las cepas *M. smegmatis* MS6039-5941 (pHSDCT) (CT, rojo) y *M. smegmatis* MS6039-5941 (pHSDCL) (CL, azul) fueron crecidas en medio mínimo 7H9 con colesterol 1,8 mM (sustrato) y distintas fuentes de carbono y energía: **(A)** glicerol 1,8 mM con adición de glucosa 1% a las 24 h de cultivo; **(B)** glucosa 1% inicial sin adiciones. Las concentraciones de AD (líneas continuas) y TS (líneas discontinuas) fueron medidas a lo largo del proceso de fermentación.

En la Fig. 48 se muestran las conversiones molares y los ratios TS/androstano de los diversos experimentos realizados. La conversión de TS fue calculada en base al colesterol añadido inicialmente en el medio de cultivo (1,8 mM). Los androstano fueron calculados como la suma de AD y TS.

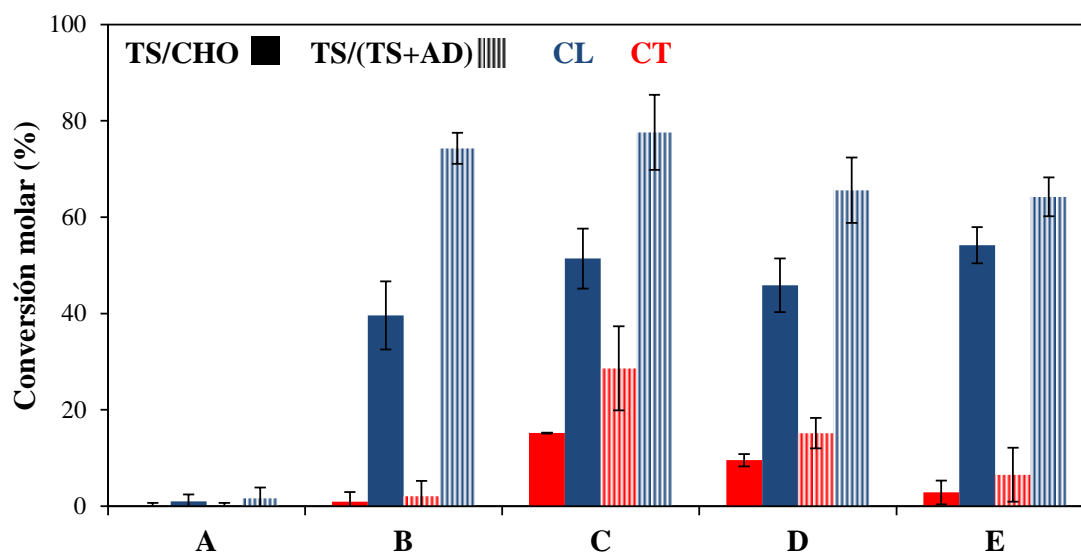


Figura 48. Producción de TS a partir de esteroides en *M. smegmatis*. Las cepas recombinantes *M. smegmatis* MS6039-5941 (pHSDCT) (CT, rojo) y *M. smegmatis* MS6039-5941 (pHSDCL) (CL, azul) fueron crecidas en medio mínimo 7H9 con colesterol 1,8 mM (sustrato) y glicerol 18 mM (fuente de carbono y energía). Las siguientes condiciones de biotransformación fueron ensayadas: **(A)** Sin adición de fuente de carbono alternativa; **(B)** Con adición de glucosa 1% a las 24 h de cultivo; **(C)** Con adición de glucosa 1% a las 69 h de cultivo; **(D)** Con adición de glicerol 1% a las 69 h de cultivo; **(E)** Sin adición de fuente de carbono alternativa, pero con glucosa 1% como fuente de carbono inicial. Se representan las conversiones molares de TS (primera y segunda barras) y el ratio de TS a androstano (tercera y cuarta barras) a las 93 h de cultivo. La conversión molar fue calculada en base al colesterol añadido (1,8 mM). Los androstano son la suma de AD y TS. Se muestran las medias y las desviación estándares de dos réplicas biológicas.

2.3. Otras modificaciones esteroideas de relevancia industrial

En este apartado se estudia la utilización de *M. smegmatis* como biofactoría celular para la modificación regio- y estereo-específica de moléculas esteroideas. Como pruebas de concepto se llevarán a cabo dos modificaciones de interés industrial: la 9 α -hidroxilación y Δ 1,2-deshidrogenación de 3-cetoesteroides.

La Δ 1,2-deshidrogenación de 3-cetoesteroides presenta un gran atractivo para la industria farmacéutica por su relevancia en distintos procesos de síntesis. Por un lado, los glucocorticoides sintéticos prednisona y prednisolona son producidos a través de reacciones de Δ 1,2-deshidrogenación a partir de cortisona e hidrocortisona, respectivamente. Por otro lado, son necesarias mejoras en la selectividad de los procesos de producción de ADD a partir de esteroides (Wei *et al.*, 2014). La Δ 1,2-deshidrogenación puede ser catalizada por enzimas 3-cetoesteroides Δ^1 -deshidrogenasas (KstD) (E.C. 1.33.99.4), es decir, proteínas FAD-dependientes que catalizan la eliminación trans-axial de los átomos de hidrógeno C-1(α) y C-2(β) de 3-cetoesteroides (Knol *et al.*, 2008).

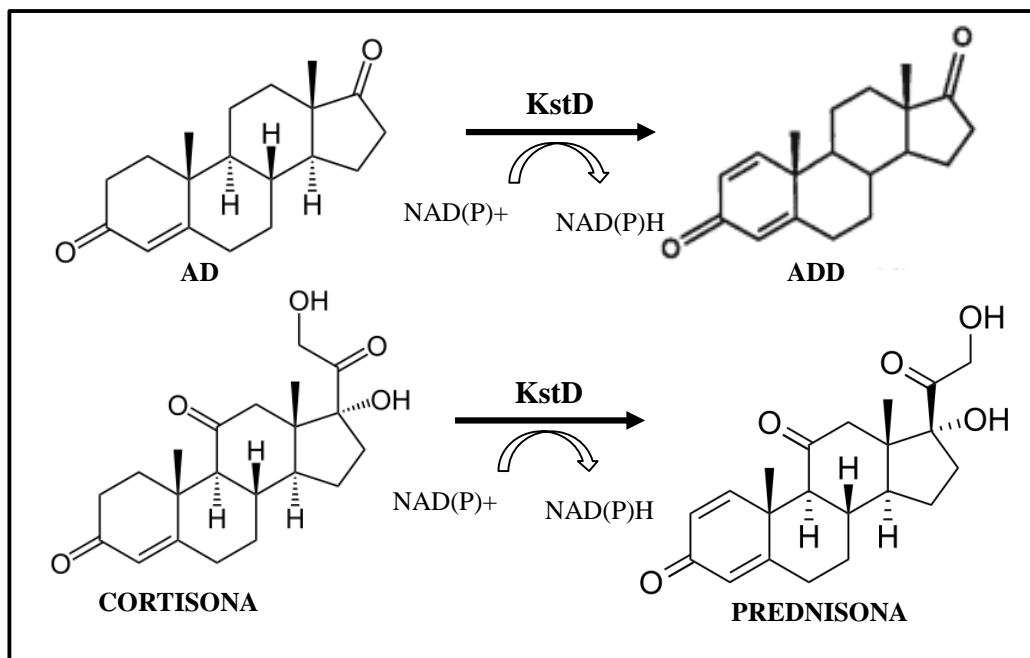


Figura 49. Representación esquemática de la Δ 1,2-deshidrogenación de 3-cetoesteroides catalizada por enzimas KstD.

La 9 α -hidroxilación de 3-cetoesteroides también presenta un gran interés industrial, ya que ciertas moléculas esteroideas con un grupo OH en el C-9 (p.ej., 9OH-AD o 9OH-progesterona) son precursores de la síntesis química de corticoesteroides. Esta modificación química puede ser catalizada por enzimas 3-cetoesteroides-9 α -hidroxilasas (KSH), es decir, proteínas monooxigenasas de dos componentes que constan de una oxigenasa terminal (KshA) y una ferredoxina reductasa (KshB) (E.C. 1.14.13.142) (Petrusma *et al.*, 2014). El componente reductasa KshB es una flavoproteína con un dominio de unión a NAD(H) y un motivo Fe-S (de tipo plantas), mientras que el componente hidroxilasa KshA contiene un motivo Fe-S (de tipo Rieske) y otro de unión a Fe^{2+} que no contiene grupo hemo.

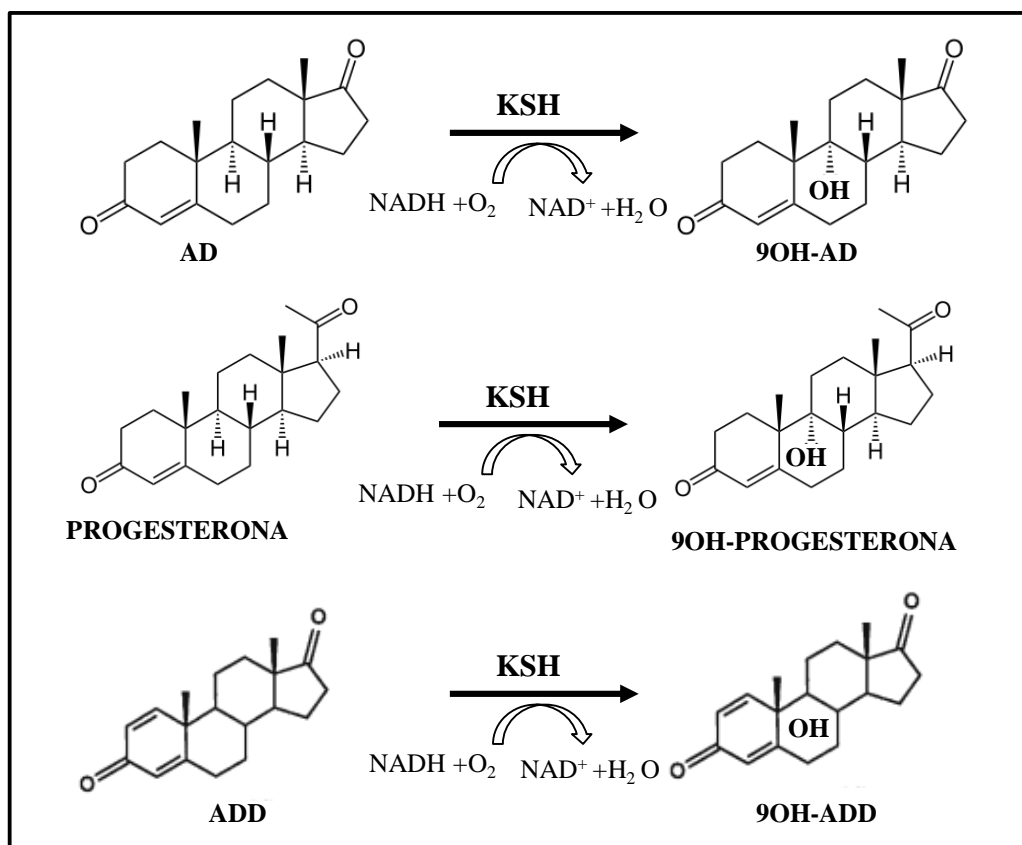


Figura 50. Representación esquemática de la 9α-hidroxilación de 3-cetoesteroides catalizada por enzimas KSH.

2.3.1. Hipótesis de trabajo: selección de los genes *kstD* y *kshA*

Un aspecto clave a considerar en las biotransformaciones microbianas es la selección de las enzimas/genes heterólogos. Varias proteínas con una misma actividad enzimática pueden presentar propiedades cinéticas diferentes (distinto rango de especificidad de sustrato, mecanismo catalítico, estabilidad proteica, etc.) que pueden determinar el éxito o el fracaso de un proceso biotecnológico. En este sentido, varios autores han demostrado que las distintas KstDs y/o KshAs caracterizadas presentan diferencias en el rango de sustratos (Knol *et al.*, 2008; Petrusma *et al.*, 2011, 2012; Fernández de las Heras, 2013; Penfield *et al.*, 2014), que en parte podrían ser explicadas por su función biológica *in vivo* en el catabolismo de distintos esteroides o moléculas estructuralmente similares.

En esta Tesis Doctoral se ha generado una colección de cepas recombinantes de *M. smegmatis* para llevar a cabo a la carta reacciones de Δ1,2-deshidrogenación y/o 9α-hidroxilación de 3-cetoesteroides en experimentos en *resting-cell*. En base a la hipótesis de que existe una relación directa entre función biológica/especificidad de sustrato, se seleccionaron las enzimas candidatas que se muestran en la Tabla 20. Para su selección, se utilizó la información disponible acerca del posible papel biológico de las enzimas candidatas y en el caso de las KstDs, también se efectuó un análisis filogenético utilizando las secuencias de otras proteínas homólogas ya caracterizadas (Fig. 51). Las secuencias KstD homólogas fueron alineadas usando el algoritmo Muscle (Edgar, 2004) y la reconstrucción filogenética fue realizada en el software MEGA v7.0 (Kumar *et al.*, 2016) utilizando el Modelo de Máxima Verosimilitud (*Maximum Likelihood Model*) con los parámetros predeterminados y validado por el Método de Bootstrap con 100 réplicas. En este sentido, las enzimas KstD1, KstD2 y KstD3 de *M. smegmatis* podrían ser ortólogas a las enzimas KstD3, KstD2 y KstD1 de *R. ruber* str. Chol-4, respectivamente, que han sido

previamente caracterizadas en estudios *in vivo* e *in vitro* (Fernández de las Heras *et al.*, 2012; Fernández de las Heras, 2013). En el caso de las KSHs, se clonó únicamente el gen *kshA* que codifica el componente hidroxilasa (KshA), el cual determina la especificidad de la enzima, ya que en estudios previos se había observado que la clonación del componente reductasa *kshB* parece no ser esencial para su actividad (Andor *et al.*, 2006; Arnell *et al.*, 2007).

Gen	Proteína	Peso molecular (kDa)	Función biológica asignada	Origen
<i>MSMEG_5941</i>	KstD1	61,01	Catabolismo del colesterol	<i>M. smegmatis</i> mc ² 155
<i>MSMEG_2869</i>	KstD2	59,73	Catabolismo de esteroides C-19	
<i>MSMEG_2867</i>	KstD3	54,81	Catabolismo de esteroides C-19	
<i>D092_22800</i>	KstD1r	53,96	Catabolismo de ácidos biliares	<i>R. ruber</i> str. Chol-4
<i>D092_19480</i>	KstD2r	60,09	Catabolismo de esteroides C-19	
<i>MSMEG_2870</i>	KshA1	43,67	Catabolismo del colesterol	<i>M. smegmatis</i> mc ² 155
<i>MSMEG_5925</i>	KshA2	43,62	Catabolismo de esteroides C-19	

Tabla 20. Genes *kstD* y *kshA* clonados en este trabajo. La determinación del peso molecular de las proteínas se realizó con el software *Compute pI/MW tool* (ExPASy).

Las secuencias génicas de los candidatos seleccionados (Tabla 20) se amplificaron por PCR usando oligonucleótidos específicos como cebadores (Tabla 9). Mientras que para la amplificación de los genes *kstD* y *kshA* de *M. smegmatis* se utilizó ADN genómico como molde, los genes *kstD1r* y *kstD2r* de *R. ruber* str. Chol-4 fueron amplificados a partir de los plásmidos pETKstD1 y pETKstD2, respectivamente (Fernández de las Heras *et al.*, 2009). Los distintos productos de PCR fueron clonados en el vector pMV261 generando los siguientes plásmidos recombinantes: (pMV2867) [*kstD3*], (pMV2869) [*kstD2*], (pMV5941) [*kstD1*], (pMV2870) [*kshA2*], (pMV5925) [*kshA1*], (pMVKstD1r) [*kstD1r*] y (pMVKstD2r) [*kstD2r*]. Los distintos plásmidos fueron indistintamente transformados en las cepas mutantes MS6039-5941 ($\Delta kshB1 \Delta kstD1$) o MS5941 ($\Delta kstD1$). Ambas cepas, a diferencia de la cepa silvestre mc²155 o el mutante MS6039 ($\Delta kshB1$), no presentan niveles basales de actividad 3-ceto- Δ^1 -esteroide deshidrogenasa (ver Fig. 52).

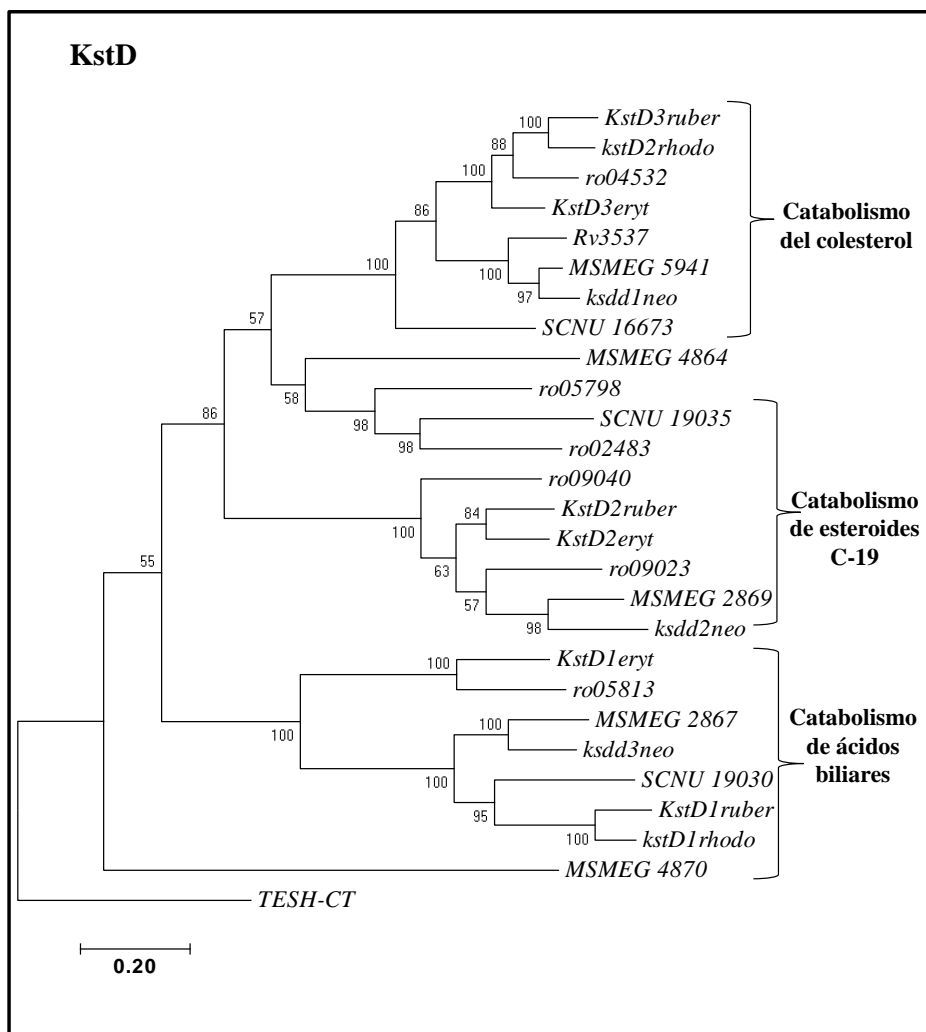


Figura 51. Filogenia de proteínas ortólogas KstD. Los números de acceso a la base de datos se muestran a continuación: *M. smegmatis* mc²155 (MSMEG 2867, YP_887187.1; MSMEG 2869, YP_887189.1; MSMEG 4864, YP_889120.1; MSMEG 4870, YP_889125.1; MSMEG 5941, YP_890167.2); *M. tuberculosis* H37Rv (Rv3537, NP_218054.1); *G. neofelifaecis* NRRL B-59395 (SCNU 16673, EGD53402.1; SCNU 19035, EGD53403.1; SCNU 19030, EGD53402.1); *R. erythropolis* SQ1 (KstD1eryt, AAF19054.1; KstD2eryt, AAL82579.1; KstD3eryt, ABW74859.1); *R. rhodochrous* DSM 43269 (KstD1rhodo, BAA22789.1; KstD2rhodo, ADY18320.1); *R. ruber* str. Chol-4 (KstD1ruber, AFH57399.1; KstD2ruber, AFH57395.1; KstD3ruber, ACS73883.1); *M. neoaurum* ATCC 25795 (Ksdd1neo, ACV13200.1; Ksdd2neo, AHG53938.1; Ksdd3neo, AHG53939.1); *R. jostii* RHA1 (ro04532, WP_050787356.1; ro05798, WP_011597906.1; ro02483, WP_011595211.1; ro09040, WP_011599760.1; ro09023, WP_011599743.1; ro05813, WP_011597919.1); *C. testosteroni* CNB-2 (TESH-CT, ACY32103.1). La escala corresponde a 0,2 sustituciones por aminoácidos.

2.3.2. Producción de 3-ceto- $\Delta^{1,2}$ -esteroides en biotransformaciones en *resting-cell*

La producción de 3-ceto- $\Delta^{1,2}$ -esteroides fue analizada en biotransformaciones en *resting-cell* utilizando las distintas cepas recombinantes desarrolladas (Ver Apartado 9.3. de Materiales y Métodos). Las células fueron resuspendidas en una solución tamponada que contenía únicamente el sustrato (distintos esteroides a una concentración de 2 mM). La evolución de las biotransformaciones fue monitorizada analizando la presencia de esteroides en el cultivo mediante cromatografía en capa fina (TLC). En la Fig. 52A se muestra la biotransformación de AD en ADD observada al cabo de 5 h de

incubación. Como se observa en la imagen, todas las cepas recombinantes fueron capaces de transformar eficientemente el AD en ADD. Sin embargo, las cepas que sobreexpresan los genes *kstD1*, *kstD2* y *kstD2r* fueron los biocatalizadores más eficaces al transformar la totalidad del sustrato en un menor tiempo. En la Fig. 52B se muestra la biotransformación de cortisona en prednisona. Todas las cepas recombinantes fueron capaces de biotransformar el sustrato parcialmente, pero únicamente la enzima KstD2 transformó la totalidad de la cortisona al cabo de 5 h. En la Fig. 53 se muestra un gel SDS-PAGE de extractos proteicos (sobrenadantes y sedimentos celulares) preparados a partir de cultivos de las distintas cepas recombinantes.

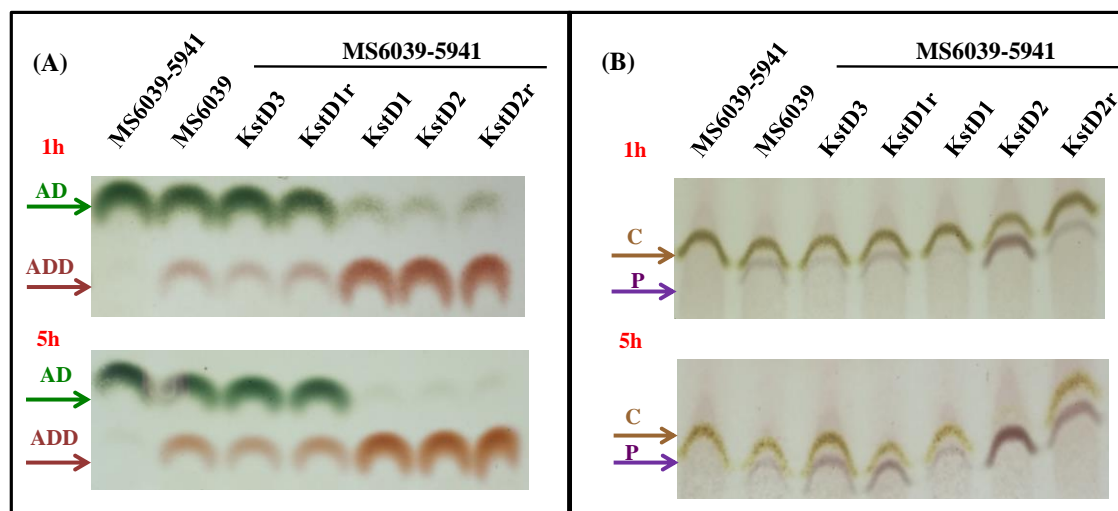


Figura 52. Producción de 3-ceto- $\Delta^{1,2}$ -esteroides mediante biotransformaciones en *resting-cell*. Análisis mediante cromatografía en capa fina (TLC) de las biotransformaciones llevadas a cabo por las cepas recombinantes de *M. smegmatis*: MS6039-5941 (pMV2867) [KstD3], MS6039-5941 (pMVKstD1r) [KstD1r], MS6039-5941 (pM5941) [KstD1], MS6039-5941 (pMV2869) [KstD2] y MS6039-5941 (pMVKstD2r) [KstD2r]. Las cepas mutantes MS6039-5941 y MS5941 fueron utilizadas como controles. Las células fueron resuspendidas en una solución tamponada que contenía únicamente el esteroide a 2 mM disuelto en Tyloxapol a una densidad óptica final (D.O.₆₀₀) de 5. **(A)** Biotransformación de AD en ADD. **(B)** Biotransformación de cortisona (C) en prednisona (P).

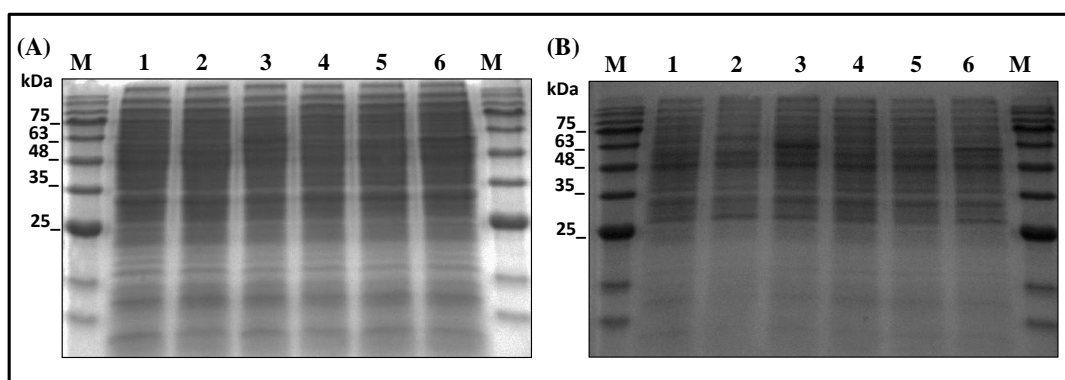


Figura 53. Gel de proteínas SDS-PAGE (12,5%) de cepas recombinantes de *M. smegmatis* sobreexpresando genes *kstD*. **(A)** Sobrenadante. **(B)** *Pellet*. Abreviaturas de las cepas utilizadas: MS6039-5941 (pMV261) [1]; MS6039-5941 (pMV2867) [2]; MS6039-5941 (pMV2869) [3]; MS6039-5941 (pMV5941) [4]; MS6039-5941 (pMVKstD1r) [5]; MS6039-5941 (pMVKstD2r) [6]. Se utilizó el marcador de peso molecular pre-teñido *BlueStar PLUS* (NIPPON Genetics) (M).

2.3.3. Producción de 9 α -hidroxi-3-cetoesteroides en biotransformaciones en *resting-cell*

La producción de 9 α -hidroxi-3-cetoesteroides también fue analizada en biotransformaciones en *resting-cell* (Ver Apartado 9.3. de Materiales y Métodos). Las células recombinantes fueron resuspendidas en una solución tamponada que contenía el esteroide a 2 mM y glucosa 1% (p/V). La evolución de las biotransformaciones fue monitorizada analizando la presencia de esteroides en el cultivo mediante cromatografía en capa fina (TLC). En la Fig. 54A se muestra la biotransformación de AD en 9OH-AD observada al cabo de 24 h de incubación. En la imagen se observa cómo sólo la cepa recombinante que sobreexpresa el gen *kshA2* transformó eficientemente el AD en 9OH-AD. Del mismo modo, sólo esta cepa fue capaz de transformar el 9OH-AD en un compuesto desconocido al cabo de 24 h (Fig. 54C). Este compuesto es muy probablemente 3-HSA, ya que en las células este compuesto se genera a partir de la molécula altamente inestable 9OH-ADD a través de un proceso espontáneo no enzimático. En cambio, la cepa recombinante que sobreexpresa el gen *kshA1* fue la única capaz de transformar eficientemente la progesterona en 9OH-progesterona (Fig. 54B).

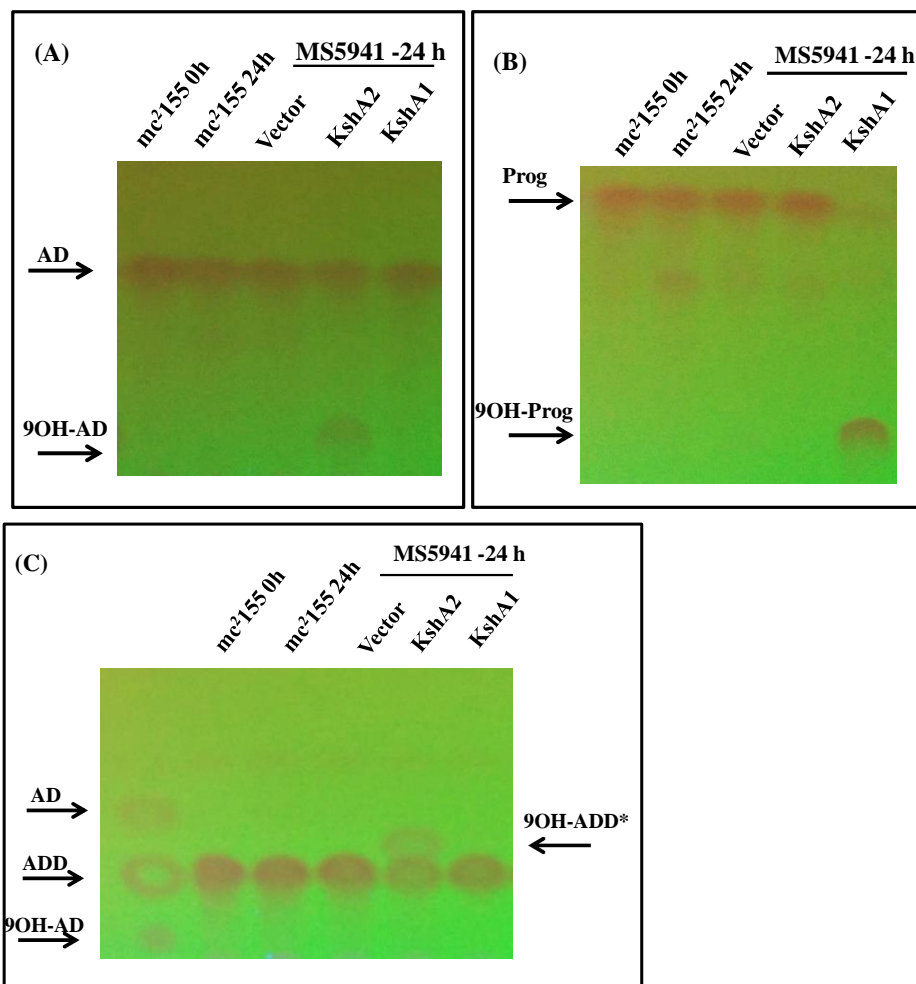


Figura 54. Producción de 9 α -hidroxiesteroides mediante biotransformaciones en *resting-cell*. Análisis mediante cromatografía en capa fina (TLC) de las biotransformaciones llevadas a cabo por las cepas recombinantes de *M. smegmatis* MS5941 (pMV2870) [KshA2] y MS5941 (pMV5925) [KshA1]. La cepa mutante MS5941 (pMV261) [Vector] y la cepa parental *mc²155* fueron utilizadas como controles. Las células recombinantes fueron resuspendidas a una densidad óptica final (D.O.₆₀₀) de 5 en una solución buffer que contenía el esteroide a 2 mM solubilizado en ciclodextrinas y glucosa 1% (p/V). **(A)** Biotransformación de AD en 9OH-ADD. **(B)** Biotransformación de progesterona (Prog) en 9OH-progesterona (9OH-Prog). **(C)** Biotransformación de ADD en 9OH-ADD. *El 9OH-ADD es un compuesto altamente inestable que se transforma en 3-HSA mediante un proceso no-enzimático.

VII. DISCUSIÓN

1. Descubrimiento de una ruta alternativa para la degradación de esteroides C-19

1.1. Catabolismo de esteroides C-19 en *M. smegmatis*

1.1.1. Descripción del fenotipo C-19+

Antes de iniciar este apartado, es necesario recordar que en esta Tesis Doctoral se ha utilizado el término “esteroide C-19” para referirse a esteroides que no presentan cadena lateral en el C-17 y en particular, para referirse a los compuestos AD, ADD y 9OH-AD.

Los esteroides C-19 han sido convencionalmente considerados intermediarios del catabolismo del colesterol en actinobacterias (Apartado 1.2.2.1., Introducción). Por ello, resulta curioso que la degradación de estos compuestos no haya sido apenas estudiada en especies de micobacterias, que son de gran relevancia en los procesos industriales de biotransformación de esteroides (Apartado 2.2.1., Introducción). Por ejemplo, al inicio de esta investigación fue posible encontrar numerosas publicaciones que describían la capacidad de la bacteria modelo *M. smegmatis* mc²155 de utilizar colesterol como única fuente de carbono y energía (Sobel y Plaut, 1949; Av-Gay y Sobouti, 2000; Kendall *et al.*, 2007; Uhía *et al.*, 2012), pero sólo se encontró un artículo que mostraba sin mucho detalle la capacidad de esta bacteria de degradar esteroides C-19 (Brzostek *et al.*, 2005). Posteriormente, y ya durante el desarrollo de la misma, se publicó otro segundo artículo (Li *et al.*, 2016). Por este motivo, en esta Tesis Doctoral se decidió comprobar si realmente *M. smegmatis* era capaz de utilizar estos compuestos como única fuente de carbono y energía.

En aparente contradicción con las hipótesis previas sobre la ruta degradación de colesterol, se observó que la cepa *M. smegmatis* mc²155 no era capaz de metabolizar esteroides C-19 (AD, ADD o 9OH-AD) después de varios días de incubación (Fig. 10A). En un principio, se pensó que las condiciones de cultivo ensayadas por otros autores quizás fueran diferentes y/o que la cepa de *M. smegmatis* mc²155 disponible en nuestro laboratorio podría necesitar más tiempo para adaptarse y crecer en esteroides C-19. Asumiendo que la fase de latencia podría ser excepcionalmente más larga para estos compuestos, se prolongaron los cultivos de *M. smegmatis* mc²155 durante más horas y se observó que a partir de las 120-150 h de incubación aparecía un crecimiento significativo y eficiente (Fig. 10B). Las células aisladas al final de los cultivos adquirieron la capacidad estable de utilizar eficientemente esteroides C-19 como única fuente de carbono y energía en ausencia de una fase de latencia larga (fenotipo C-19+) (Fig. 10C), incluso después de varios pases en medio rico sólido y líquido en ausencia de esteroides, sugiriendo que había tenido lugar una adaptación genotípica (mutación). Las células adaptadas a un esteroide C-19 particular (p. ej., AD) también adquirieron la capacidad de crecer en otros esteroides C-19 (p. ej., AD, ADD y 9OH-AD).

Con el objetivo de averiguar las bases del fenotipo C-19+ y la incapacidad de las cepas silvestres de crecer en esteroides C-19, se identificaron las etapas que podrían ser limitantes en el catabolismo de estos compuestos: transporte, toxicidad y/o regulación. En este sentido, desde un primer momento se descartó el transporte como un factor limitante en la degradación de esteroides C-19 en las cepas silvestres, puesto que en los ensayos de biotransformaciones en *M. smegmatis* se había comprobado que estos compuestos pueden ser transportados por estas células (p. ej., ver Apartado 2 de Resultados). En segundo lugar, se descartó un posible efecto tóxico de los esteroides C-19 en las cepas

de *M. smegmatis* en el rango de concentraciones de trabajo (1-2 mM). La toxicidad de ciertas hormonas esteroideas y ciertos derivados como por ejemplo el AD o ADD ha sido previamente descrita en distintos organismos (Lee y Liu, 1992; Smith *et al.*, 1993; Cvelbar *et al.*, 2013), pero no es relevante para la explicación de este fenotipo en *M. smegmatis*. En tercer lugar, se analizó la capacidad de mineralizar esteroides C-19 en la cepa mutante *M. smegmatis* Δ kstR, que expresa constitutivamente el regulón *kstR* del colesterol (Kendall *et al.*, 2007; Uhía *et al.*, 2012). Esta cepa fue capaz de metabolizar el AD o ADD con muchas dificultades y no pudo metabolizar el 9OH-AD (Fig. 11), mostrando por tanto un comportamiento fenotípico diferente a las cepas C-19+. En esta línea, también se descartó la implicación del regulón *kstR* en el catabolismo de esteroides C-19 en las cepas C-19+, analizando los niveles de transcripción de algunos de sus genes clave (p. ej., *kstD1*, *kshB1*, *kshA1*, *hsaA1*) (Fig. 13).

Todos estos resultados indicaban que otro conjunto de enzimas estaba involucrado en la degradación de esteroides C-19 en las cepas C-19+. También demostraban que los esteroides C-19 no inducen el regulón *kstR* en *M. smegmatis*, así como que la expresión génica basal de este regulón no es suficiente para promover el crecimiento en AD o ADD en la cepa silvestre. Por otra parte, parece ser que a través de la ruta catabólica del colesterol sólo se logra una degradación parcial de AD o ADD y no se metaboliza el 9OH-AD. Esto sugiere que la enzima KstD1 no es capaz de deshidrogenar el 9OH-AD, aunque si parece deshidrogenar con serias dificultades el AD. Probablemente, esto se debe o bien a que los sustratos reales de esta enzima en el catabolismo de esteroides son compuestos C-22 o C-24 que aún retienen parte de la cadena lateral o bien a que no es capaz de deshidrogenar eficientemente esteroides 9 α -hidroxilados. En este sentido, Capyk *et al.* (2009b) han demostrado una clara preferencia de la enzima KshAB de *M. tuberculosis* por ADD, sugiriendo que en esta bacteria la Δ 1,2-deshidrogenación por la KstD1 precede a la 9 α -hidroxilación. También diversos autores han demostrado que algunas de las enzimas involucradas en el catabolismo de esteroides (p. ej., KSH) presentan mayor afinidad por sustratos acil-CoA derivados de la degradación parcial de la cadena lateral (Capyk *et al.*, 2011; Penfield *et al.*, 2014).

En este punto, se decidió descartar que las múltiples mutaciones acumuladas en la cepa mc²155 que en su día se realizaron para convertirla en una cepa “supercompetente” (Snapper *et al.*, 1990; Etienne *et al.*, 2005) eran responsables del fenotipo observado. Para ello, se verificó que la cepa parental de referencia *M. smegmatis* DSM 43465 (ATCC 607) presentaba el mismo comportamiento, es decir, no crecía en esteroides C-19 pero se adaptaba a crecer establemente en estos compuestos al cabo de más de 120 h. Siguiendo esta misma estrategia, se comprobó que la adaptación para crecer en esteroides C-19 es un fenómeno reproducible y extensible a otras cepas de *M. smegmatis* (p. ej., mutante MS6039-5941 (Δ kshB1 Δ kstD1)). Por ello, se acuñó el término “cepa C-19+” para referirse a todas aquellas cepas que presentaban un fenotipo C-19+, es decir, que crecían eficientemente utilizando esteroides C-19 como única fuente de carbono y energía en ausencia de una fase de latencia larga. Por el contrario, se utilizó el término “cepa parental/silvestre” para referirse a las cepas a partir de las que se habían obtenido las cepas C-19+ después de más de 120-150 h de incubación en esteroides C-19 y que por tanto, no eran capaces de crecer eficientemente en estos compuestos.

1.1.2. Identificación de un *cluster* génico involucrado en la degradación de esteroides C-19

Teniendo en cuenta el papel clave de las enzimas KshA1 (MSMEG_5925), KshB1 (MSMEG_6039) y KstD1 (MSMEG_5941) en el catabolismo del colesterol en *M. smegmatis* mc²155 (Brozstek *et al.*, 2005; Galán *et al.*, 2017; Apartado 2.1. de Resultados) y sabiendo de la existencia de

genes homólogos en el genoma, se decidió realizar un análisis *in silico* con más detalle. En este análisis se anotaron un gen homólogo *kshA* (*MSMEG_2870*, *kshA2*) y un gen homólogo *kshB* (*MSMEG_2893*, *kshB2*) y, se identificaron varios posibles homólogos *kstD* (*MSMEG_2869*, *kstD2*; *MSMEG_2867*, *kstD3*; *MSMEG_4864*, *kstD4*; *MSMEG_4870*, *kstD5*) (Tabla 12). Curiosamente, próximos al único gen homólogo *kshA* (*kshA2*), se localizaban los genes *kshB2*, *kstD2* y *kstD3*. Estudiando con más detalle su contexto genómico, se identificaron numerosos genes que codificaban enzimas posiblemente relacionadas con el metabolismo de esteroides. Por ejemplo, se anotaron los genes *MSMEG_2891*, *MSMEG_2892* y *MSMEG_2900* que codificaban posibles proteínas homólogas HsaC, HsaA y HsaD, respectivamente (Tabla 13). También se identificaron los genes *MSMEG_2890*, *MSMEG_2868* y *MSMEG_2898* que codificaban posiblemente reguladores transcripcionales de las familias IclR (nº acceso Pfam PF01614), PadR (nº acceso Pfam PF03551) y TetR (nº acceso Pfam PF00440), respectivamente (Molina-Henares *et al.*, 2006; Fibriansah *et al.*, 2012; Cuthbertson y Nodwell, 2013). De este modo, se delimitó una región genómica denominada *cluster C-19+*, que al menos incluía los genes *MSMEG_2851-MSMEG_2901* y que podía estar involucrada en el catabolismo de esteroides C-19 en *M. smegmatis* (Tabla 14). Todos los genes de este posible *cluster* no presentaban regiones operadoras *kstR* o *kstR2* en sus regiones promotoras (Kendall *et al.*, 2007, 2010), ni se vieron inducidos en presencia de colesterol en experimentos de *microarrays* previos (Kendall *et al.*, 2007; Uhía *et al.*, 2012).

Para confirmar nuestra hipótesis, se analizó la expresión génica del *cluster C-19+* por RT-PCR semicuantitativa en varias cepas C-19+ y en sus respectivas cepas parentales (Fig. 15). En estos análisis se demostró que los genes del *cluster C-19+* son expresados constitutivamente en los mutantes C-19+ y permanecen “silentes” (con bajo nivel de expresión basal) en las cepas silvestres en todas las condiciones de cultivo ensayadas (inclusive en presencia de colesterol y de esteroides C-19), explicando por tanto por qué estas últimas eran incapaces de crecer en esteroides C-19. También se verificó que los genes del *cluster C-19+* no forman parte del regulón *kstR*, ya que no eran transcritos o presentaban los mismos niveles de expresión basal en la cepa silvestre mc²155 en presencia de colesterol o en la cepa mutante *M. smegmatis* Δ kstR. Este aspecto ya se había observado en los experimentos de *microarrays* realizados en *M. smegmatis* mc²155 (Uhía *et al.*, 2012) y en el mutante *M. smegmatis* Δ kstR (Kendall *et al.*, 2007), en los que se demostró que el *cluster C-19+* no se sobreexpresa en presencia de colesterol ni en condiciones de desrepresión total (mutante Δ kstR), respectivamente.

Dado que estos resultados sugerían que las cepas C-19+ presentaban alguna proteína/circuito regulatorio modificado que provocaba la expresión constitutiva del *cluster C-19+*, se estudiaron con más detalle los genes de los reguladores transcripcionales localizados en el mismo (*padR*, *iclR*, *tetR*). Analizando sus secuencias en una cepa C-19+ (ADD+) y en la cepa parental correspondiente (mc²155), se identificó la presencia de una única mutación en el gen *padR* (*MSMEG_2868*) de la cepa ADD+. Se ampliaron los análisis de secuenciación del gen *padR* a otras cepas C-19+ aisladas y se detectaron diversos tipos de mutaciones (inserciones, deleciones y cambios de nucleótidos puntuales), que afectaban indistintamente a la secuencia de aminoácidos de las regiones N-terminal y C-terminal de la proteína PadR (Tabla 15). El ejemplo más llamativo fue una gran deleción genómica encontrada en la cepa mutante M2, que incluía gran parte del regulador *padR* y del gen *MSMEG_2867* que codifica la enzima KstD3. Esta mutación indicaba que KstD3 no juega un papel esencial en el catabolismo de esteroides C-19 en *M. smegmatis*. La construcción posterior de un mutante de deleción génica denominado *M. smegmatis* MS2868 (Δ *padR*), permitió demostrar que la proteína PadR actúa como regulador transcripcional reprimiendo directa o indirectamente la expresión de los genes del *cluster C-19+* que son responsables del catabolismo de esteroides C-19 (Fig. 18, 19).

Por último, se realizó un análisis *in silico* para identificar secuencias operadoras en las regiones promotoras de algunos de los genes más significativos del *cluster* C-19+ en *M. smegmatis*. Como se puede observar en la Figura 55, fue posible identificar secuencias palindrómicas comunes en varias secuencias promotoras. Sin embargo, para verificar que el regulador PadR reconoce estas secuencias operadoras serán necesarios análisis *in silico* más detallados y otro tipo de aproximaciones experimentales (p. ej., ensayos de cambio de movilidad electroforética del ADN, EMSA; análisis de ADN footprint). La identificación de una segunda región palindrómica en la secuencia promotora del gen *iclR* (Fig. 55), sugiere que el circuito regulatorio del *cluster* C-19+ puede ser más complejo implicando a varios reguladores en cascada. De hecho, los resultados experimentales anteriormente mostrados no excluyen la posibilidad de que otros genes reguladores, como por ejemplo los genes *iclR* y/o *tetR*, desempeñen un papel importante en el fenotipo C-19+.

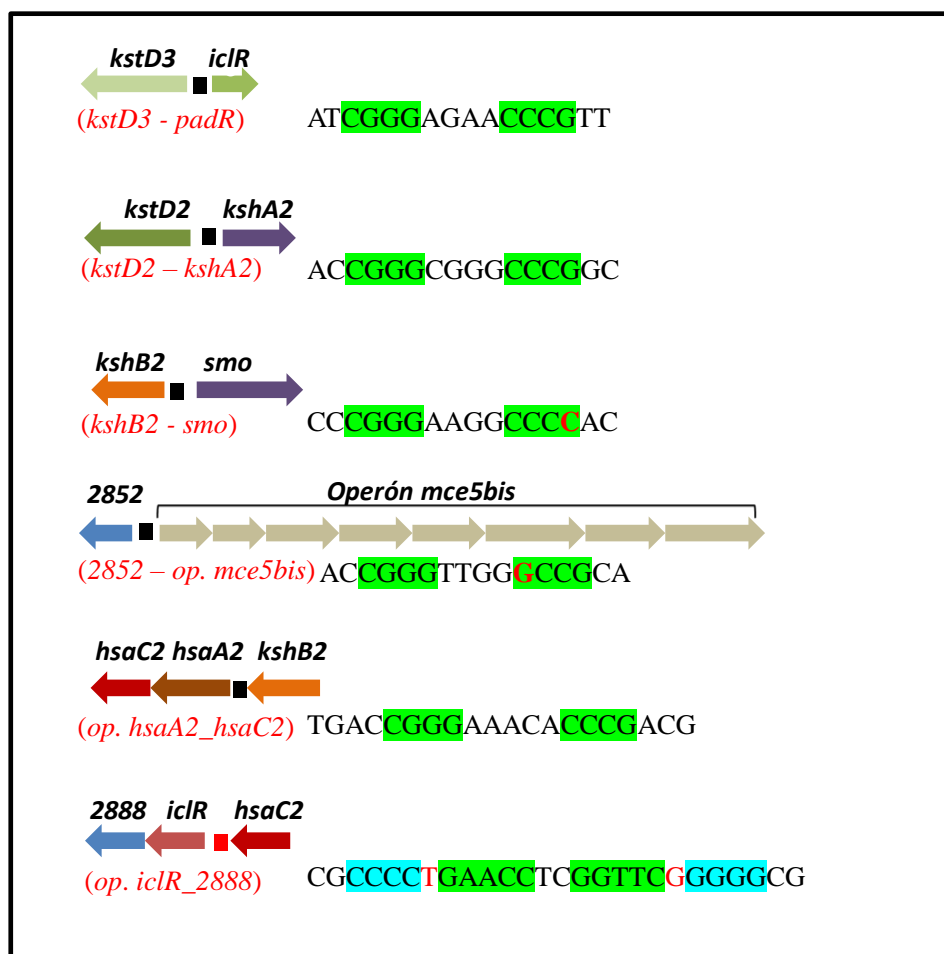


Figura 55. Identificación de palíndromos en las secuencias promotoras de los genes del *cluster* C-19+ en *M. smegmatis* mc²155. Las secuencias palindrómicas se han anotado manualmente y se representan con cuadrados. Nomenclatura de la anotación génica: MSMEG_(número), (NC_008596.1). Abreviaturas: op. (operón).

A continuación, para confirmar la función y/o la esencialidad biológica de determinados genes del *cluster* C-19+ en el catabolismo de esteroides C-19, se construyeron varios mutantes de delección génica simple en la cepa ADD+: MS2891 (Δ *hsaC1*), MS2892 (Δ *hsaA1*) y MS2900 (Δ *hsaD1*). Los resultados obtenidos en los ensayos de crecimiento en esteroides C-19 y de complementación génica de estas cepas permitieron concluir que: (i) los genes *MSMEG_2891*, *MSMEG_2892* y *MSMEG_2900*

codifican enzimas con actividad 3,4-HSA dioxigenasa, 3-HSA monooxigenasa (componente oxigenasa) y 4-9-DSHA hidrolasa, respectivamente; (ii) los tres genes son esenciales para el catabolismo de esteroides C-19 (p.ej., AD) (Apartado 1.1.8.2., Resultados).

Por otra parte, se demostró que los genes *MSMEG_2869* (*kstD2*) y *MSMEG_2893* (*kshB2*) codifican enzimas con actividad 3-cetoesteroide- Δ^1 -deshidrogenasa y 3-cetoesteroide-9 α -hidroxilasa (componente reductasa), respectivamente. Estos genes fueron capaces de complementar *en trans* los mutantes de delección génica de *M. smegmatis* de la ruta del colesterol (cepas MS5941 ($\Delta kstD1$) y MS6039 ($\Delta kshB1$), respectivamente), revirtiendo su incapacidad de mineralizar colesterol (Fig. 21). En cambio, la proteína KstD3 (*MSMEG_2867*) no fue capaz de suplir la actividad enzimática de KstD1 en el mutante MS5941 (Fig. 21), a pesar de presentar actividad enzimática Δ^1 -deshidrogenasa sobre 3-cetoesteroides en biotransformaciones en *resting-cell* (Fig. 22) y en ensayos de actividad enzimática *in vitro* (datos no mostrados). En este sentido, las isoenzimas KstD probablemente presentan diferentes especificidades de sustrato y por tanto, sólo en algunos casos, incluso en condiciones de sobreexpresión, son capaces de suplir *in vivo* la función biológica de las otras isoenzimas. Por último, se demostró que la enzima KshA2, codificada por el gen *MSMEG_2870*, presentaba actividad enzimática 3-cetoesteroide-9 α -hidroxilasa en biotransformaciones en *resting-cell* (Fig. 22).

Los resultados aquí presentados confirman los datos publicados por otros autores como Petrusma *et al.*, (2011) que identificaron 5 genes *kshA* involucrados en el catabolismo de esteroides en la bacteria *R. rhodochrous* DSM 43269, que mostraban un patrón de expresión diferencial en presencia de varios sustratos (p. ej., colesterol, colato, AD o progesterona). Las proteínas KshAs codificadas por estos genes, presentaban preferencias por sustratos y/o selectividades diferenciales y sólo en algunos casos, su hiperproducción revertía el crecimiento del mutante *kshA*⁻ quintuple en uno o varios tipos de esteroides. En la misma línea, Brzostek *et al.*, (2005) observaron que la sobreexpresión del gen *ksdD-2* (*MSMEG_4870*) en el mutante *M. smegmatis* $\Delta ksdD-1$ ($\Delta MSMEG_5941$) revertía la incapacidad de la cepa de crecer en colesterol, a pesar de que la enzima KsdD-2 no está involucrada en el catabolismo de esteroides en *M. smegmatis*.

1.1.3. Reformulación del catabolismo de esteroides

Los resultados presentados en esta Tesis Doctoral sugieren que es necesario reformular el catabolismo de esteroides en actinobacterias y en particular, en *M. smegmatis* mc²155 como se ilustra en la Fig. 56.

Convencionalmente, se ha asumido que los esteroides C-19 (AD, ADD y 9OH-AD) son intermediarios del catabolismo aeróbico del colesterol en actinobacterias por múltiples evidencias (García *et al.*, 2012) (Fig. 5). Por un lado, estos compuestos C-19 se han detectado en los cultivos de distintas actinobacterias en presencia de esteroides (Marshack *et al.*, 1972; Wei *et al.*, 2010a). Por otro lado, existen varios ejemplos de bacterias capaces de utilizar tanto el colesterol como los esteroides C-19 como únicas fuentes de carbono y energía. Este es el caso de *R. erythropolis* str. SQ1 (van der Geize *et al.*, 2000), *R. ruber* str. Chol-4 (Fernández de las Heras *et al.*, 2009), *R. rhodochrous* DSM 43269 (Petrusma *et al.*, 2011) o *G. neofelifaecis* NRRL B-59395 (Li *et al.*, 2014). Por último, a través de las distintas aproximaciones de Ingeniería Metabólica llevadas a cabo fundamentalmente en bacterias del género *Mycobacterium* y explicadas con mayor detalle en el Apartado 2.2.1. (Introducción), se ha demostrado que es posible reconducir el flujo metabólico hacia la acumulación de intermediarios esteroideos C-19 mediante la interrupción racional del catabolismo de esteroides.

En contraste con esta hipótesis, varios estudios indican que algunas modificaciones introducidas en los anillos A/B del núcleo esteroideo en el catabolismo de esteroides (p. ej., la 9 α -hidroxilación y la Δ 1,2-deshidrogenación) ocurren simultáneamente con la degradación de la cadena lateral. Varios grupos han demostrado que algunas de las enzimas involucradas en el catabolismo del colesterol (p. ej., KSH) presentan mayor afinidad por sustratos acil-CoA derivados de la degradación parcial de la cadena lateral, que aún presentan 3 ó más carbonos de la misma (Capyk *et al.*, 2011; Penfield *et al.*, 2014). También se han detectado diversos intermediarios C-22 o C-24 después de inhibir la apertura del anillo B durante el catabolismo de esteroides (p. ej., mediante delección de los genes *ksh* y/o *kstD*) (Szentirmai, 1990; Donova *et al.*, 2005a; Wilbrink *et al.*, 2011; Yeh *et al.*, 2014; Galán *et al.*, 2017). Del mismo modo, se han aislado cepas mutantes productoras de algunos de estos intermediarios C-22 a partir de esteroides tanto por mutagénesis clásica como por aproximaciones de Ingeniería Metabólica (Imada y Takahashi, 1980; Wilbrink *et al.*, 2011; Xu *et al.*, 2016). Por tanto, estos resultados y los datos aportados en esta Tesis Doctoral, apoyan la hipótesis de que los compuestos AD, ADD o 9OH-AD no son verdaderos intermediarios de la ruta de esteroides en actinobacterias, sino que son subproductos generados a consecuencia de la interrupción de la ruta catabólica de esteroides (p. ej., mediante mutación de los genes *kshA*, *kshB* y/o *kstD*).

En la ruta catabólica de esteroides aquí propuesta, la degradación de la cadena lateral y las modificaciones químicas introducidas en los anillos A/B del núcleo esteroideo tienen lugar simultáneamente y por tanto, la ruta catabólica de esteroides en *M. smegmatis* en ningún caso pasa por la formación mayoritaria de AD, ADD o 9OH-AD (Fig. 56). La acción enzimática de las proteínas codificadas por el regulón *kstR* provoca la acumulación de los metabolitos HHD y HIP, que son metabolizados por las enzimas codificadas por el operón *hsaEFG* y por el regulón *kstR2*, respectivamente (Fig. 56). No está claro en qué momento tiene lugar la degradación total de la cadena lateral del colesterol, pero con los datos disponibles es posible realizar algunas especulaciones. Teniendo en cuenta que los mejores sustratos de la enzima KSH de *M. tuberculosis* son derivados acil-CoA que aún retienen parte de la cadena lateral (Capyk *et al.*, 2011) y que distintos intermediarios esteroideos C-22 son generados por las cepas de micobacterias productoras de esteroides C-19 en presencia de esteroides (Donova *et al.*, 2005a; Yeh *et al.*, 2014; Galán *et al.*, 2017), se puede asumir que las reacciones de Δ 1,2-deshidrogenación y 9 α -hidroxilación ocurren antes de la liberación de la última molécula de ácido propiónico de la cadena lateral. Por otra parte, el hecho de que en el mutante Δ *hsaC* de *R. jostii* RHA1 también se detecten intermediarios catecólicos con la cadena lateral parcialmente degradada en presencia de esteroides, sugiere que esta modificación química puede ser previa a la degradación total de la cadena lateral (van der Geize *et al.*, 2007).

En los próximos años será necesario trabajar en la determinación de los “verdaderos intermediarios” de la ruta catabólica de esteroides. Esta tarea no va a resultar sencilla puesto que probablemente varios intermediarios esteroideos están coexistiendo en el citoplasma celular durante su degradación. Teniendo en cuenta que muchas de las enzimas involucradas tanto en la degradación de la cadena lateral como en la modificación de los anillos A/B son capaces de actuar sobre distintos sustratos (aunque presenten sustratos preferentes), uno puede imaginarse un conjunto de intermediarios esteroideos con distintas modificaciones/grados de metabolización formando un entramado (red) metabólico, cuya suma proporciona un flujo metabólico que facilita la degradación de esteroides. Esta hipótesis no descarta la existencia de sustratos preferentes y/o de una ruta (flujo) metabólica mayoritaria, pero dificulta la obtención de conclusiones claras utilizando aproximaciones *in vivo* (p. ej., diseño de mutantes de delección génica). Por otro lado, los análisis bioquímicos *in vitro* no siempre son un fiel reflejo de las condiciones reales en el citoplasma celular y requieren en muchos casos del uso de sustratos

activados (derivados CoA) de difícil fabricación y baja estabilidad. Por todo ello, resultará muy complicado determinar al detalle la ruta catabólica de esteroides en actinobacterias.

Por otro lado, en esta Tesis Doctoral se propone la existencia de una nueva ruta catabólica en *M. smegmatis* denominada ruta C-19+ involucrada en el catabolismo de esteroides C-19 (Fig. 56). El “regulón *padR*” (o “regulón C-19+”) codifica un conjunto de enzimas que catalizan la modificación de los anillos A/B de los compuestos C-19, generando los intermediarios HHD y HIP. No está claro si la degradación de HHD tiene lugar por la acción de las enzimas HsaE, HsaF y HsaG que son codificadas por el operón *hsaEFG* del regulón *kstR*. Es posible que este compuesto sea metabolizado a través de esta vía, ya que se han detectado niveles basales de expresión del operón *hsaEFG* en presencia de esteroides C-19 y en los análisis *in silico* no se han identificado otros genes homólogos en el genoma *M. smegmatis*. Estos genes no están siempre presentes en todos los *clusters* génicos de catabolismo de esteroides en actinobacterias (Bergstrand *et al.*, 2016), ya que codifican enzimas que son comunes en muchas rutas catabólicas de compuestos aromáticos y por ello a veces se disponen en distintas localizaciones del genoma. Por otra parte, la degradación de HIP tiene lugar vía regulón *kstR2*, de manera que la ruta C-19+ converge con la ruta catabólica de esteroides como se ilustra en la Fig. 56. Este tipo de convergencia a nivel del regulón *kstR2*, ya ha sido descrita en otras actinobacterias como por ejemplo en *R. jostii* RHA1 (Mohn *et al.*, 2012).

Por otra parte, la diferencia en el crecimiento en colesterol observada entre las cepas C-19+ (p. ej., ADD+ y MS2868) y la cepa silvestre mc²155 (Fig. 27D), sugiere que la expresión constitutiva del regulón *padR* en las cepas C-19+ interfiere en la mineralización de colesterol a través de la ruta catabólica clásica (regulón *kstR*). La presencia de un conjunto alternativo de enzimas en las cepas C-19+ podría estar desviando el flujo metabólico hacia rutas laterales catabólicamente menos eficaces, llevando a una reducción significativa en la velocidad de crecimiento en colesterol. El hecho de que esta diferencia fuera aún más notable en los mutantes de delección ADD+ Δ *hsaA2* (MS2892) y ADD+ Δ *hsaC2* (MS2891) apoya esta hipótesis. De hecho, en esta última cepa, se observó una coloración rosácea en el medio de cultivo en presencia de esteroides debida a la acumulación de intermediarios catecólicos, que indicaba que una parte del flujo metabólico estaba siendo redirigida hacia la ruta C-19+. Por otro lado, el hecho de que las cepas C-19+ derivadas de MS6039-5941 (Δ *kshB1* Δ *kstD1*) presentaran un crecimiento diferencial en esteroides C-19 respecto a otras cepas C-19+ aisladas (p. ej., ADD+) (Fig. 27A, B, C), sugiere que las enzimas KshB1 y/o KstD1 intervienen en cierta medida en la mineralización de esteroides C-19. Puede ser que los niveles basales de estas enzimas presentes en las células favorezcan la metabolización de estos compuestos en las cepas C-19+.

En este punto, resulta importante explicar por qué el *cluster* C-19+, que parece estar involucrado en el catabolismo de esteroides C-19 en *M. smegmatis*, no se induce en presencia de estos compuestos (p. ej., AD, ADD, 9OH-AD). Una posible explicación es que este *cluster* esté diseñado evolutivamente para degradar otros compuestos estructuralmente relacionados. En este trabajo, con el objetivo de identificar moléculas esteroideas que pudieran actuar como inductores de la ruta, se analizó la capacidad de *M. smegmatis* de utilizar otros derivados esteroideos (p. ej., testosterona, progesterona o estradiol) como única fuente de carbono y/o energía. En algunos de los ensayos se observó que la bacteria se adaptaba a crecer en los compuestos después de más de 140 h de cultivo y adquiría el fenotipo C-19+ (datos no mostrados), pero no se pudo identificar un verdadero inductor de la ruta catabólica aquí denominada ruta C-19+. Por otro lado, tampoco se puede descartar la hipótesis de que el gen/es regulatorio/s que controlan la expresión del *cluster* C-19+ en *M. smegmatis* (p. ej., *padR*, *iclR* u otros) hayan perdido la capacidad de reconocer esteroides C-19 o intermediarios derivados como inductores.

Sin embargo, la exploración de esta hipótesis requerirá de múltiples estudios adicionales.

Para concluir, se deben mencionar otras publicaciones que *a priori* pueden resultar contradictorias con los resultados y el esquema catabólico arriba propuesto. Por un lado, Brzostek *et al.* (2005) mostraron la metabolización de AD en una cepa de *M. smegmatis* mc²155. Dado que en estos experimentos únicamente se monitorizaba la desaparición de AD y el medio de cultivo también presentaba otras fuentes de carbono y energía (p. ej., glucosa o glicerol), no es posible comparar estas conclusiones con nuestro trabajo. Por otro lado, Li *et al.* (2016) publicaron un perfil transcriptómico de una cepa de *M. smegmatis* mc²155 cultivada en medio mínimo con colesterol, AD o glicerol. Sus resultados mostraban que el colesterol inducía la expresión de un gran número de genes que coinciden con el catabolón del colesterol descrito previamente en esta bacteria con análisis de *microarrays* (Kendall *et al.*, 2007; Uhía *et al.*, 2012). Sus datos también mostraban que el esteroide AD no producía la misma respuesta transcripcional que el colesterol ni inducía otro grupo de genes catabólicos diferentes, aunque observaban crecimiento en este compuesto. Analizando los datos suplementarios proporcionados por estos autores, se ha comprobado que en estos experimentos el AD no indujo el *cluster* C-19+ que se ha descrito en esta Tesis Doctoral. También se ha comprobado que el medio mínimo utilizado para los experimentos de *RNA-seq* contenía una importante cantidad de acetato de amonio (1,5 g/L), que en nuestra experiencia puede explicar el crecimiento de *M. smegmatis* observado en presencia de AD. Por tanto, en la misma línea que nuestros resultados, estos análisis transcriptómicos demuestran que el AD no induce el catabolón del colesterol ni el *cluster* C-19+ en *M. smegmatis* mc²155.

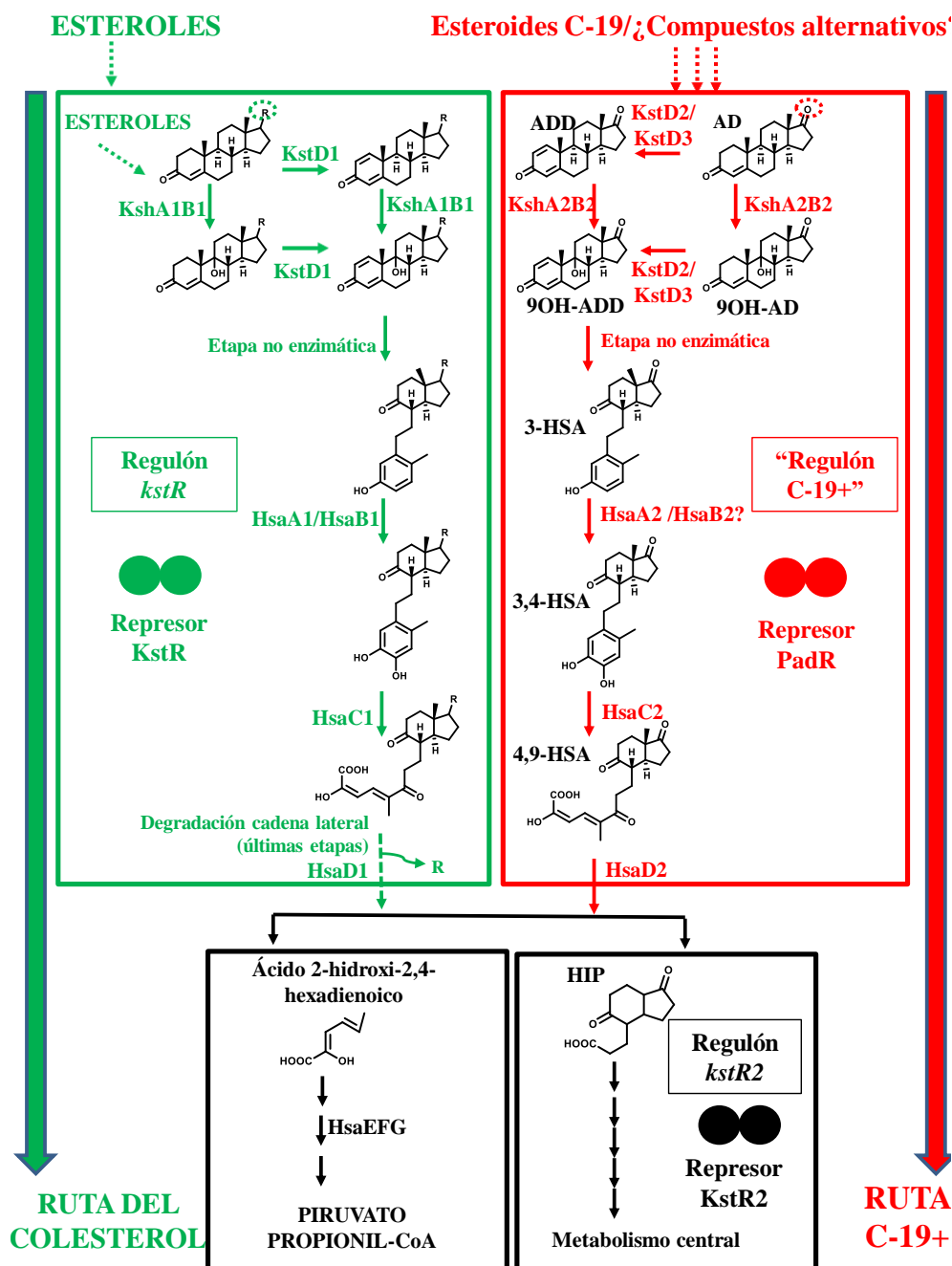


Figura 56. Rutas catabólicas propuestas para la degradación de esteroides en *M. smegmatis* mc²155. Se proponen dos rutas catabólicas alternativas para la degradación de esteroides (ruta del colesterol) y de esteroides C-19 (ruta C-19+). La ruta del colesterol está regulada transcripcionalmente por el represor KstR (regulón *kstR*), mientras que la ruta C-19+ estaría regulada por el regulador PadR (“regulón C-19+” o “regulón *padR*”). Ambas rutas convergen en una vía común para la degradación de los anillos esteroideos C y D (regulón *kstR2*). La degradación de la cadena lateral y la modificación de los anillos A/B ocurren simultáneamente en el catabolismo de esteroides. Abreviaturas de enzimas: 3-cetoesteroide- Δ^1 -deshidrogenasa (KstD), 3-cetoesteroide-9 α -hidroxilasa (KshAB), 3-hidroxi-9,10-secoandrosta-1,3,5(10)-trien-9,17-diona 4 hidroxilasa (HsaAB), 3,4-dihidroxi-9,10-secoandrosta-1,3,5(10)-trien-9,17-diona dioxigenasa (HsaC), ácido 4,5-9,10-diseco-3-hidroxi-5,9,17-trioxoandrosta-1(10),2-dien-4-oico hidroxilasa (HsaD), 2-hidroxipentadionato hidratasa (HsaE), 4-hidroxi-2-cetovaleratoaldolasa (HsaF) y acetaldehído deshidrogenasa (HsaG). Abreviaturas de los metabolitos: 4-androsten-3,17-diona (AD), 1,4-androstadien-3,17-diona (ADD), 9-hidroxi-4-androsten-3,17-diona (9OH-AD), 9-hidroxi-1,4-androstadien-3,17-diona (9OH-ADD), 3-hidroxi-9,10-secoandrosta-1,3,5(10)-trien-9,17-diona (3-HSA), 3,4-dihidroxi-9,10-secoandrosta-1,3,5(10)-trien-9,17-diona (3,4-DHSA), 4,5,9,10-diseco-3-hidroxi-5,9,17-trioxoandrosta-1(10),2-dien-4-oico (4,9-DSHA) y ácido 9,17-dioxo-1,2,3,4,10,19-hexanorandrostano-5-oico (HIP).

1.1.4. Identificación del origen de los mutantes en la población microbiana

En las últimas décadas se ha estudiado con gran detalle los procesos de generación y selección de mutantes en las poblaciones bacterianas. Estos fenómenos son clave en muchos procesos relevantes como por ejemplo la adquisición de mecanismos de resistencia a antibióticos (p. ej., Martínez y Baquero, 2000). Cuando una población bacteriana es expuesta a condiciones selectivas (p. ej., presencia de un antibiótico o cultivos en medios mínimos con fuentes de carbono únicas), se observa un fenómeno de “desplazamiento” por parte de aquellas bacterias de la población (mutantes) que son capaces de sobrevivir y/o dividirse en dichas condiciones. Existen fundamentalmente dos teorías que explican la aparición de estos mutantes: la primera teoría defiende que estos mutantes están presentes en la población inicial y la segunda defiende que los mutantes aparecen como consecuencia de la exposición a condiciones selectivas de estrés (Anderson y Purdom, 2009; Jayaraman, 2011).

Con el objetivo de discernir cuál de estas dos teorías explica el origen de las cepas C-19+ de *M. smegmatis*, se planteó el experimento detallado en el Apartado 1.1.7. (Resultados). La identificación del mismo tipo de mutantes *padR* en varios cultivos de adaptación al crecimiento en esteroides C-19 independientes sugirió que dichos mutantes estaban presentes en la población original (preinóculo) y eran seleccionados *a posteriori*. De esta manera, las células mutantes que expresaban el *cluster* C-19+ estaban presentes en la población inicial y sólo fueron seleccionadas tras ser cultivadas en condiciones de presión selectiva (una única fuente de carbono). En estas condiciones, las cepas C-19+ fueron capaces de desplazar al resto de la población, por ser las únicas capaces de crecer y dividirse eficientemente en dichas condiciones. Teniendo en cuenta que los mutantes están presentes en una pequeña proporción en el inóculo, es lógico observar división/crecimiento bacteriano en el cultivo sólo cuando un determinado número de horas ha transcurrido (> 150 h). Es importante señalar que estos resultados no excluyen la posibilidad de que otras mutaciones *padR* se generen como consecuencia de la exposición a condiciones selectivas de estrés. Sin embargo, para explicar esta hipótesis, se debe asumir que la mutación *padR* se produce y estabiliza dentro de células que sobreviven y quizás replican utilizando sus propios reservorios de carbono/energía y/o el carbono liberado por la lisis de otras células bacterianas.

En las últimas décadas se han documentado otros ejemplos de adaptación a nuevos sustratos (adquisición de la capacidad de metabolizar ciertos sustratos o hacerlo más eficazmente) bajo condiciones de presión selectiva en bacterias (Wick *et al.*, 2002; Herring *et al.*, 2006). La comprensión de los mecanismos de adaptación bacteriana ha avanzado en gran medida gracias al desarrollo de nuevas tecnologías de secuenciación, que permiten identificar rápidamente mutaciones en las cepas adaptadas y evaluar la contribución de las mismas en los fenotipos observados (Brockhurst *et al.*, 2011). Generalmente, los cambios genómicos responsables de estos fenómenos de adaptación afectan a enzimas que actúan directamente sobre el sustrato, ARN polimerasas, regiones promotoras o elementos reguladores globales (Herring *et al.*, 2006). Curiosamente, la adaptación mediada por mutaciones en reguladores transcripcionales locales, como por ejemplo la descrita en esta Tesis Doctoral, parece ser menos frecuente (Barrick *et al.*, 2009). Sin embargo, la hipótesis de que las mutaciones de reguladores transcripcionales son claves en los procesos de evolución microbianos es ampliamente aceptada (Dekel y Alon, 2005; Balaji *et al.*, 2007). Esta hipótesis concuerda con la observación de que la regulación transcripcional parece haber evolucionado y cambiado más rápido que otros sistemas de interacción biológica como por ejemplo las interacciones entre proteínas o las redes metabólicas (Shou *et al.*, 2011). Otro ejemplo de adaptación mediada por mutaciones en reguladores locales fue descrita por Summers *et al.* (2012), quienes observaron que una mutación puntual en un regulador transcripcional generaba

mejoras notables en la capacidad de metabolizar lactato por la bacteria *Geobacter sulfurreducens*.

1.2. Catabolismo de esteroides en otras bacterias

1.2.1. Identificación del *cluster* C-19+ en otras actinobacterias

En esta Tesis Doctoral se realizaron análisis *in silico* para identificar la presencia del *cluster* C-19+ en otras especies de actinobacterias. Debido al papel relevante que parece tener el gen *padR* (*MSMEG_2868*) en el catabolismo de esteroides C-19 en *M. smegmatis*, la búsqueda inicial se centró en la identificación de genes homólogos en las bases de datos. A continuación, en aquellos casos en los que se encontraron similitudes de secuencia significativas, se analizó su contexto genómico con el objetivo de buscar homólogos del resto de genes presentes en el *cluster* C-19+ de *M. smegmatis*. En primer lugar, estos análisis se centraron en especies del género *Mycobacterium* (Apartado 1.2.1., Resultados). Después de confirmar la presencia del *cluster* C-19+ en algunas micobacterias y definir ciertos patrones de conservación génica, se expandió la búsqueda a otras especies de actinobacterias.

1.2.1.1. Especies de micobacterias

En estos análisis *in silico* se observó que algunas micobacterias aisladas del medio ambiente, como por ejemplo *M. vanbaalenii* PYR-1 o *M. neoaurum* DSM 44074, presentan un *cluster* C-19+ con una organización génica muy similar a la de *M. smegmatis*. Otras micobacterias ambientales como *M. gilvum* Spyr1 o micobacterias patógenas no-estrictas como *M. avium subsp. paratuberculosis* str. K10, contienen un *cluster* C-19+ análogo con algunos reordenamientos génicos. En cambio, varios patógenos estrictos como por ejemplo *M. tuberculosis* H37Rv o *M. leprae* TN no presentan este *cluster*. Por tanto, a la vista de estos análisis, se podría especular con un posible papel nutricional del *cluster* C-19+ en bacterias ambientales y/o patógenas no-estrictas que suelen estar presentes en nichos ambientales, que es prescindible en bacterias patógenas estrictas.

En este sentido, con el objetivo de verificar los límites genómicos previamente establecidos en el *cluster* C-19+ se realizó una comparación a escala genómica entre *M. tuberculosis* H37Rv y *M. smegmatis* mc²155. En estos análisis se observó que existe una conservación genómica *upstream* y *downstream* del *cluster* C-19+ (Fig. 29), apoyando la hipótesis de una coevolución con adquisición/pérdida de capacidades nutricionales asociada a la adquisición/pérdida del *cluster* C-19+. Si este *cluster* ha sido adquirido por *M. smegmatis* o perdido por *M. tuberculosis* es un aspecto debatible y no puede ser fácilmente elucidado. Es interesante señalar que varios genes que codifican proteínas que podrían estar involucradas en patogénesis (p. ej., proteínas de estrés, sistemas toxina-antitoxina, proteínas de respuesta hipóxica) se localizan en *M. tuberculosis* en el mismo lugar del *cluster* C-19+ (Rustad *et al.*, 2009; Fernández-García *et al.*, 2016). En este punto resulta también importante mencionar que Hu *et al.* (2010) publicaron que *M. tuberculosis* utiliza el AD como única fuente de carbono y energía, a pesar de que las cepas de *M. tuberculosis* no contienen el *cluster* C-19+. Una posible explicación de este fenómeno sería que *M. tuberculosis* presenta una expresión basal del regulón *kstR* y unas enzimas KshAB y KstD más activas sobre compuestos C-19 que permiten la metabolización de AD más eficientemente que en otras micobacterias en las que el catabolismo del colesterol está más regulado. Sin embargo, tanto el crecimiento en AD como esta hipótesis requieren de revisión adicional y confirmación.

Por otra parte, también se comprobó que las cepas industriales *M. neoaurum* VKM Ac-1815D y *Mycobacterium* sp. NRRL B-3805 no presentan el *cluster* C-19+. Cuando se compararon sus genomas con el de la especie filogenéticamente próxima *M. neoaurum* DSM 44074 (ATCC 25795), se identificó una delección precisa del *cluster* C-19+ en ambas cepas industriales (Fig. 30). Estas cepas se han obtenido después de largos procesos de mutagénesis y selección que tenían como objetivo obtener bacterias altamente productoras de AD a partir esteroides. Por ello, es razonable pensar que las cepas que no contienen o han perdido el *cluster* C-19+, presenten claras ventajas productivas y hayan sido seleccionadas. También se demostró que *M. neoaurum* DSM 44074 se comporta como *M. smegmatis*, es decir, no es capaz de metabolizar esteroides C-19 desde el principio del cultivo pero adquiere el fenotipo C-19+ tras inactivar el gen *padR* (Fig. 31). En este sentido, Yao *et al.* (2013) mostraron la metabolización de AD en la cepa silvestre de *M. neoaurum* ATCC 25795. Al igual que los experimentos antes mencionados de Brzostek *et al.* (2005) en *M. smegmatis*, estos autores monitorizaron la desaparición de AD y utilizaron un medio de cultivo que presentaba otras fuentes de carbono y energía (p. ej., glucosa o glicerol), por lo que sus conclusiones no se pueden comparar con nuestros resultados.

1.2.1.2. *G. neofelifaecis* NRRL B-59395

Li *et al.* (2014) identificaron tres *clusters* génicos involucrados en el catabolismo de esteroides (*cluster* 1, *cluster* 2 y *cluster* 3) en *G. neofelifaecis* NRRL B-59395, a partir de los análisis *RNAseq* realizados en presencia de distintos sustratos (i. e., colesterol, AD, piruvato). Estos autores determinaron que los genes involucrados en la degradación de la cadena lateral del colesterol son sobreexpresados exclusivamente en presencia de colesterol, mientras que los genes involucrados en la modificación de los anillos A/B y de los anillos C/D son sobreexpresados en presencia de AD y colesterol. A través de análisis *in silico*, hemos observado que el *cluster* C-19+ de *M. smegmatis* presenta similitudes significativas con el *cluster* génico 2 de *G. neofelifaecis* identificado por Li *et al.* (2014) y de acuerdo con los resultados publicados, hemos reinterpretado y postulado el catabolismo de esteroides en esta bacteria. Mediante anotación *in silico*, se puede comprobar que los *clusters* génicos 1 y 3 contienen los genes del regulón *kstR* del colesterol descrito en numerosas actinobacterias (p. ej., operón *mce4* y genes codificando las enzimas que intervienen en la degradación de la cadena lateral y en la modificación de los anillos A/B). Atendiendo a los resultados publicados, la mayoría de los genes de los *clusters* génicos 1 y 3 se inducen en presencia de colesterol, mientras que el *cluster* génico 2 se induce en presencia de colesterol y AD. Por tanto, se podría asumir que el *cluster* C-19+ de esta bacteria ha sido evolutivamente seleccionado para degradar esteroides C-19 (p. ej., AD) y que puede contribuir en la degradación de los mismos cuando se generan como subproductos en el catabolismo de esteroides. Como en el caso de *M. smegmatis* y otras bacterias como por ejemplo *R. jostii* RHA1 (Mohn *et al.*, 2012), el catabolismo de distintos esteroides en *G. neofelifaecis* parece converger en una ruta común para la degradación de los anillos C/D (catabolón *kstR2*). No obstante, hemos comprobado que los genes del regulón *kstR2* se disponen en otra localización genómica (p. ej., el operón *SCNU_14039-SCNU_14044* es homólogo a *MSMEG_6011-MSMEG_6012*) que no se corresponde a los genes anotados por Li *et al.* (2014) dentro del *cluster* génico 2.

1.2.1.3. *R. jostii* RHA1

La actinobacteria modelo *R. jostii* RHA1 presenta cuatro agrupaciones génicas involucradas en la degradación de esteroides: *cluster* 1 (*ro04531-ro04705*), *cluster* 2 (*ro02478-ro02492*), *cluster* 3 (*ro05788-ro05832*) y *cluster* 4 (*ro09002-ro09040*), éste último presente en el plásmido pRHL1. Cada uno

de estos *clusters* contiene distintos genes que podrían codificar enzimas involucradas en la modificación de los anillos A y B de distintos esteroides (van der Geize *et al.*, 2007; Mathieu *et al.*, 2010; Mohn *et al.*, 2012; Haußmann *et al.*, 2013). Se ha demostrado que el *cluster* 1 y el *cluster* 3 codifican las enzimas responsables del catabolismo del colesterol y de ácidos biliares (colato y sus derivados), respectivamente (van der Geize *et al.*, 2007; Mohn *et al.*, 2012). En cambio, la degradación de 7-cetocolesterol parece necesitar la intervención de enzimas de diversos *clusters*, puesto que varias enzimas del catabolón del colesterol (p. ej., sistema de transporte Mce4, Cyp125 y HsaC) y de los *clusters* 2 y 3 parecen ser necesarias para la mineralización de este compuesto (Mathieu *et al.*, 2010). Curiosamente, el 7-cetocolesterol induce la expresión de genes presentes en los cuatro *clusters* (fundamentalmente de los *clusters* 2 y 3), aunque muchos de ellos parecen no ser esenciales para su mineralización. Por este motivo, la asignación de una función biológica *in vivo* a cada uno de estos *clusters* génicos parece no ser evidente.

A través de análisis *in silico*, se ha comprobado que el *cluster* C-19+ de *M. smegmatis* presenta similitudes significativas con los *clusters* génicos 2 y 4 presentes en *R. jostii* RHA1 (Fig. 32). El *cluster* 2 presenta una mayor similitud (en cuanto a la organización génica y contenido génico) al *cluster* génico 2 presente en *G. neofelificis*, mientras que el *cluster* 4 presenta una mayor similitud al *cluster* C-19+ de *M. smegmatis*. Las enzimas KstDs y KshA contenidas en el *cluster* 4, son ortólogas a las enzimas identificadas en otras bacterias del género *Rhodococcus*, en las que se ha demostrado que son relevantes en la degradación de esteroides C-19. Por ejemplo, Fernández de las Heras *et al.* (2012) demostraron que la enzima KstD2 de *R. ruber* str.Chol-4, que es ortóloga a la codificada por el gen *ro09023* (*RHA1_RS40180*) en *R. jostii*, está involucrada en la degradación de AD/9OH-AD. Del mismo modo, Liu *et al.* (2016) demostraron que la enzima KsdD2 de *R. rhodochrous* DSM43269, que también es ortóloga a la codificada por el gen *ro09023* en *R. jostii*, es la principal enzima involucrada en la degradación de AD y 9OH-AD en esta bacteria. En la misma línea, van der Geize *et al.* (2000, 2002a) demostraron la existencia de una actividad enzimática KstD2 mayoritaria en *R. erythropolis* SQ1, que en combinación con la actividad minoritaria KstD1, eran responsables del catabolismo de AD y 9OH-AD en esta bacteria. El doble mutante de delección génica ($\Delta kstD1$, $\Delta kstD2$) de esta bacteria fue incapaz de crecer en estos compuestos, pero presentaba un crecimiento normal en colesterol (no acumulaba intermediarios). Del mismo modo, la enzima KshA1 fue la única actividad responsable de la degradación de AD y ADD en esta bacteria y parece no ser esencial para el catabolismo de esteroides (van der Geize *et al.*, 2002b).

1.2.1.4. *N. simplex* VKM Ac-2033D

Shtratnikova *et al.* (2016) anotaron mediante análisis *in silico* cinco posibles *clusters* génicos involucrados en la degradación de esteroides en la bacteria *Nocardioideis simplex* (antes *Arthrobacter simplex*) VKM Ac-2033D: *cluster* A (KR76_14160-KR76_14505), *cluster* B (KR76_12190-KR76_12345), *cluster* C (KR76_25015-KR76_25200), *cluster* D (KR76_27035-KR76_27130) y *cluster* E (KR76_17995-KR76_18070). En nuestros análisis se observó que parte del *cluster* D es análogo al *cluster* C-19+ de *M. smegmatis* (Fig. 32). A diferencia de lo observado en otras especies de actinobacterias, no se encontró ningún regulador transcripcional *padR*, *iclR* ni *tetR* homólogo en este *cluster*, aunque sí se localizaron posibles homólogos en otras partes del genoma (Tabla 18). Sólo se identificó un único regulón *kstR2* que se localiza en el *cluster* A.

1.2.1.5. Otras especies de actinobacterias

Con el objetivo de identificar la presencia del *cluster* C-19+ en otros géneros de actinobacterias, se analizó en las bases de datos la existencia de posibles reguladores transcripcionales y/o proteínas homólogas a las descritas en la ruta catabólica C-19+ de *M. smegmatis* (p. ej., PadR, IclR, KshA2, HsaC2, HsaA2, KstD2, KstD3). De esta manera, se identificaron múltiples especies de distintos géneros (p. ej., *Nocardia*, *Streptomyces*, *Amycolatopsis*, *Actinomadura*, *Thermomonospora*) que contenían genes homólogos. Estudiando con mayor detalle la organización genómica de algunos de estos *clusters*, se verificó la existencia de *clusters* C-19+ análogos en las bacterias *N. cyriacigerogica*, *N. fusca*, *T. curvata*, *S. albida* y *A. rifamycinii*.

1.2.2. Comparativa genómica global de los *clusters* C-19+

1.2.2.1. Comparativas de proteínas PadR

En esta Tesis Doctoral se ha demostrado que la proteína PadR desempeña un papel clave en el catabolismo de esteroides C-19 en *M. smegmatis*, al regular transcripcionalmente el *cluster* C-19+.

La familia de proteínas PadR (nº acceso, Pfam PF03551) constituye un grupo de factores de transcripción ampliamente distribuido en bacterias que están involucrados en la regulación de distintos procesos (p. ej., resistencia a drogas, virulencia y detoxificación). El nombre de esta familia proviene del descubrimiento del primero de sus representantes, el regulador PadR, un represor que está involucrado en la respuesta al estrés en presencia de ácido fenólico en bacterias gram positivas como *B. subtilis*, *Pediococcus pentosaceus* y *Lactobacillus plantarum* (Barthelmebs *et al.*, 2000; Gury *et al.*, 2004; Tran *et al.*, 2008). Hasta el momento, sólo se han estudiado unos pocos miembros de la familia PadR por métodos genéticos, bioquímicos y/o biofísicos, y su relación estructura/función aún no está bien definida. Algunos ejemplos de proteínas PadR son: la proteína AphA de *Vibrio cholerae* que activa la expresión de genes de virulencia (Wang *et al.*, 2013a); las proteínas LmrR and LadR que reprimen los genes de una bomba de expulsión multi-drogas en *Lactococcus lactis* y *Listeria monocytogenes*, respectivamente (Lubelski *et al.*, 2006; Huillet *et al.*, 2006); la proteína Pex que regula los ritmos circadianos en *Synechococcus* sp. (Kutsuna *et al.*, 2007). Se han realizado estudios cristalográficos de las proteínas AphA, LmrR y Pex y se ha confirmado que estas proteínas comparten un plegamiento común que consta de dos dominios: un dominio conservado N-terminal de 80-90 aa que está involucrado en la unión de ADN (motivo wHTH, *winged helix-turn-helix*), y un dominio C-terminal variable con una o más hélices que interviene en la dimerización de la proteína (De Silva *et al.*, 2005; Fibriansah *et al.*, 2012). En función del tamaño del dominio C-terminal se pueden distinguir dos grupos de reguladores PadR: subfamilia 1 y subfamilia 2. La subfamilia 1 incluye proteínas de aproximadamente 180 aa con un dominio C-terminal grande (80-90 aa) con múltiples hélices (p. ej., AphA, PadR, LadR). La subfamilia 2 está formada por proteínas de aproximadamente 110 aa con un dominio C-terminal más pequeño (20-30 aa) que forma una única hélice (p. ej., LmrR).

La proteína PadR de *M. smegmatis* presenta 231 aa (YP_887188.1; pI/MW: 5.00/ 26147,40 Da) y contiene un dominio C-terminal con múltiples hélices, por lo que se podría incluir dentro de la subfamilia 1 de reguladores PadR. En la Figura 57, se muestra la estructura primaria de esta proteína, así como una predicción *in silico* de su estructura secundaria obtenida con el programa bioinformático JPred (Drozdetskiy *et al.*, 2015). En esta figura se indican las posiciones y el tipo de mutaciones encontradas en

M. neoaurum DSM 44074), mientras que en las especies de *Rhodococcus* y *Gordonia* existe un Trp en esa posición (ver Anexo II). Curiosamente, las predicciones *in silico* de estructura secundaria determinaron que las proteínas con un Trp presentan una lámina-β que no está presente en las proteínas con una Ser (JPred, Expasy) (Fig. 58). La mutación *in silico* de Ser49Trp en la proteína PadR de *M. smegmatis* provocó la aparición de una lámina-β en esa localización (Fig. 58). Es posible que esta mutación, que afecta al dominio N-terminal de la proteína involucrado en la unión a ADN, cause cambios en la funcionalidad de la proteína que expliquen las diferencias fenotípicas observadas en el catabolismo de esteroides C-19 en las distintas especies de actinobacterias. Sin embargo, esta hipótesis es una mera especulación que debe ser verificada experimentalmente. Por ejemplo, puede ser interesante comprobar si la mutación puntual Ser49Trp de PadR en *M. smegmatis* provoca un cambio en la funcionalidad biológica del represor, generando una proteína inactiva o un represor que es capaz de reconocer a esteroides C-19. También es importante verificar si otros *clusters* C-19+ se inducen en presencia de esteroides C-19 o son constitutivos (p. ej., de actinobacterias que degradan eficientemente esteroides C-19).

>*M. smegmatis* mc²155 (MSMEG_2868)

MTDAADTPLGELNVSPTGWALLGMLS GGDELSGYDIKKWINWA IQFFYS SPAYSQIYSELKR
LERLGLVSSRV DAGARSRMYKIT DAGLSAVTRWANEEAVEPPTLKHNPVLRVMLGHLLKPG
RLREVLAEHADYADRMHQAAATEARWTEQPAWSYAGLALRWSERYYAAERELALQMIKDLD
AVEAQLAETGAQNMEFPVREYWYEVERRIAAEETDETTPPGAQRPD

>*M. smegmatis* mc²155 (MSMEG_2868) (PadR S49W)

MTDAADTPLGELNVSPTGWALLGMLS GGDELSGYDIKKWINWA IQFFYWS PAYSQIYSELKR
LERLGLVSSRV DAGARSRMYKIT DAGLSAVTRWANEEAVEPPTLKHNPVLRVMLGHLLKPG
RLREVLAEHADYADRMHQAAATEARWTEQPAWSYAGLALRWSERYYAAERELALQMIKDLD
AVEAQLAETGAQNMEFPVREYWYEVERRIAAEETDETTPPGAQRPD

>*R. jostii* RH1 RHA1 RS40155

MPTPVRSSHDLPA TSWAVLGMLS FGEELT GNDLKKWADWS IGF FYWSPSVSQVYAEKKLE
NLALVRSRTVAEVGARGRRVYAIT QSGATALRDWSRDAPVEMPVLKHGVMLRLWMGHLLPE
RLKSIVREHIANLEANARDAGRHAHHSNDEPAWAFSRMSLRWADRHLRAEIELAEQLLEDID
EAAQWFRDETVDVDDNGVPRPRHPGRWRYAEDAGDPSGDQHSR

>*L. plantarum*

MAQKNKLQFIILGLLNQQPLTGYDLTKAFDDEIGEFWQAQHSQIYPQLKRLEEQGYVTHEIT
VSGEKLEK KLYHITATGRQLLHEWISVGTPDLTATKDE FILKLYFTQ TDRDPRLAMLQEQL
TLHTAKLAHLQORLATVFPQAKAAKQHYGHYILQHAIGREDYVNWLNKQTLKALPE

Figura 58. Representación esquemática de los reguladores transcripcionales PadR de varias actinobacterias. Se representa la estructura primaria y una predicción de la estructura secundaria (software JPred; Expasy) de las siguientes proteínas PadR: (A) *M. smegmatis* mc²155, YP_887188.1; (B) *M. smegmatis* mc²155, mutación S49W -YP_887188.1; (C) *R. jostii* RHA1, WP_011599737.1; (D) *L. plantarum*, YP_004891132.1. Las hélices α y las láminas β predichas son mostradas de color verde y rojo, respectivamente. La proteína de *L. plantarum* se utilizó como referencia de la subfamilia 1 de reguladores PadR.

1.2.2.2. Otras comparativas generales

Resulta realmente complejo extraer conclusiones generales acerca de la composición génica mínima y/o la existencia de patrones de organización génica en los *clusters* C-19+ de actinobacterias. Sin embargo, sobre la base de las características de los *clusters* analizados en este trabajo, se han podido establecer las siguientes generalidades:

- Los genes *hsaA* y *hsaC* se encuentran siempre presentes formando parte de una única unidad transcripcional.
- Los genes *kshA* y *kstD* se localizan en distintas localizaciones de los *clusters* C-19+ y forman parte posiblemente de unidades transcripcionales individuales.
- Los genes *hsaB*, *hsaD* y *kshB* suelen estar presentes en todos los *clusters* C-19+.
- Algunos genes como por ejemplo *smo* o el operón *hsaEFG* están presentes sólo en los *clusters* C-19+ de algunas especies, pero en todos los casos es posible identificar uno o varios homólogos en otras localizaciones genómicas.
- Los reguladores *padR* e *iclR* forman parte de unidades transcripcionales individuales y están presentes en todos los *clusters* analizados (excepto en *N. simplex* VKM Ac-2033D).
- El gen regulatorio *tetR* de *M. smegmatis* no está presente en ninguno de los *clusters* analizados. Estos *clusters* presentan otros genes regulatorios que varían de unas especies a otras.

Una vez que se han establecido estas pautas generales, es necesario mencionar otros datos que podrían en cierta medida contrarrestar la generalidad de estas pautas. Se han identificado distintas especies de actinobacterias que presentan *clusters* C-19+ similares, que también contienen los reguladores *padR* e *iclR* (p. ej., *Streptomyces lavendulae*, NZ_JOEW01000008.1, *IF07_RS0109775-IF07_RS0109830*). Sin embargo, se ha observado que las identidades de secuencia y la organización transcripcional de determinados genes catabólicos de los mismos recuerdan más a los *clusters* del catabolismo de colesterol de otras actinobacterias. Por ejemplo, el posible operón *IF07_RS0109810-IF07_RS0109825* de *S. lavendulae* podría ser homólogo al operón *MSMEG_6038-MSMEG_6035* de *M. smegmatis*, que codifica las enzimas HsaA1, HsaD1, HsaC1 y HsaB1 del catabolismo del colesterol. Estas observaciones son una muestra de la complejidad evolutiva de las rutas catabólicas de esteroides en bacterias y ponen de manifiesto la necesidad de utilizar aproximaciones bioinformáticas que faciliten un estudio global del catabolismo de esteroides.

1.2.3. Evolución del catabolismo de esteroides en bacterias

La presencia de rutas catabólicas de esteroides en distintos taxones bacterianos sugiere un posible escenario de evolución divergente (Ver Apartado 1.2.1., Introducción). En este sentido, Bergstrand *et al.* (2016) postularon la existencia de una ruta ancestral de degradación de esteroides en un antepasado del suborden Corynebacterineae que dio lugar a la ruta catabólica del colesterol actual. Esta hipótesis se apoya en el hecho de que la ruta catabólica de esteroides está presente en la mayoría de los géneros de este suborden. Sin embargo, es cierto que no se pueden descartar otras hipótesis alternativas, incluso la posibilidad de un origen de la ruta en Proteobacterias. Siguiendo con esta especulación, la distribución desigual de la ruta catabólica del colesterol en el suborden Corynebacterineae

sugiere que se originó a través de la duplicación génica de la ruta de degradación del colesterol en un antepasado del género *Rhodococcus*. La existencia de otras rutas catabólicas de degradación de esteroides homólogas en varias especies de *Rhodococcus*, sugiere la existencia de múltiples duplicaciones génicas de las rutas del colesterol y del colato. Los genes que codifican la degradación de los anillos C/D de esteroides no se han duplicado en los genomas de estas bacterias y suelen estar localizados próximos al regulón del colesterol (Bergstrand *et al.*, 2016).

Por otro lado, la existencia de rutas catabólicas del colesterol o del colato en otras actinobacterias fuera del suborden Corynebacterineae sugiere la existencia de eventos de transferencia horizontal y/o vertical (Bergstrand *et al.*, 2016). Debido a la disponibilidad limitada de secuencias genómicas de estas especies, no es aún posible priorizar una de estas opciones. Por otra parte, la distribución irregular de la ruta monofilética de testosterona/colato en especies de Proteobacterias, sugiere la existencia de un único evento de transferencia horizontal desde una actinobacteria y sucesivos eventos de transferencia horizontal entre especies de Proteobacterias. Esta hipótesis es apoyada en parte por los estudios filogenéticos realizados por Bergstrand *et al.* (2016), en los que se observa una filogenia incongruente de ARNr 16S y proteínas de catabolismo de esteroides en representantes de Proteobacterias. La disposición genómica de determinados *clusters* de degradación de esteroides en actinobacterias, así como su posible localización en plásmidos, también apoya la hipótesis de eventos de transferencia horizontal de rutas completas o componentes de las mismas. Por ejemplo, el *cluster* génico localizado en el plásmido pRHL1 de *R. jostii* RHA1 (*cluster* 4), que presenta gran similitud con los *clusters* del catabolismo de colato de actinobacterias, probablemente haya contribuido a estos eventos de transferencia horizontal. Esta explicación también es consistente con la localización de genes del catabolismo de la testosterona/colato en plásmidos de *Novosphingobium* sp.

En definitiva, existen indicios suficientes como para especular sobre un evento de duplicación génica de un *cluster* del catabolismo de colato que dio origen a un *cluster* análogo C-19+ en un antecesor de *Rhodococcus*. La existencia de sucesivos eventos de transferencia génica horizontal facilitados por diversos elementos móviles contribuyó a la adquisición posterior de este *cluster* por otras especies bacterianas (p. ej., especies del género *Mycobacterium*), que adquirieron nuevas capacidades nutricionales que les confieren posiblemente ventajas selectivas en nichos ecológicos ambientales. La identificación de transposasas próximas (y normalmente en los extremos) a algunos *clusters* C-19+ identificados, apoyan la existencia de eventos de transferencia horizontal múltiple. Este es el caso de *M. smegmatis* mc²155, en el que es posible identificar una zona rica en transposasas en uno de los extremos del *cluster* C-19+ (*MSMEG_2818-MSMEG_2830*) y un pseudo-gen truncado por una transposasa en el otro extremo (*MSMEG_2903*). La mayor identidad de las secuencias proteicas de los *clusters* C-19+ con las rutas catabólicas de colato observadas en esta Tesis Doctoral también apoyan la especulación de una duplicación ancestral del *cluster* catabólico del colato (Ver árboles filogenéticos, Apartado 1.2.4. de Resultados).

2. *M. smegmatis*: una biofactoría para la producción de esteroides

En esta Tesis Doctoral y en otros trabajos llevados a cabo en nuestro laboratorio (Galán *et al.*, 2017; Felpeto-Santero, 2016), se han diseñado mediante aproximaciones de Ingeniería Metabólica bacterias productoras de compuestos esteroideos de interés (p. ej., AD, ADD, 9OH-AD, TS) utilizando *M. smegmatis* mc²155 como modelo. Sorprendentemente, esta bacteria no había sido utilizada como biofactoría celular para aplicaciones industriales a pesar de los numerosos estudios existentes de su biología. Al inicio de estos trabajos, sólo existía un caso en la literatura de un mutante resistente a antibióticos capaz de transformar esteroides en AD depositado como *M. smegmatis* VKPM Ac-1552 en la Colección Nacional Rusa de Microorganismos (VKPM) (Patente de la Federación Rusa n.º. 2 126 837 (1999), revisado en Donova (2007)).

A continuación, se enumeran las características que hacen de esta micobacteria una biofactoría celular de elección para la producción de esteroides:

- **Actinobacteria no patógena:**

Esta bacteria fue por primera vez aislada en exudados de secreciones genitales, pero ha sido re-clasificada como microorganismo ambiental ya que ha sido identificada en muestras de suelo y agua (Tsukamura, 1976; Alvarez y Tavel., 1885). Distintas colecciones de cultivo, como por ejemplo la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC), recomiendan el manejo de esta bacteria con las medidas propias de un nivel de bioseguridad tipo I. Por el contrario, otras especies de micobacterias que podrían ser utilizadas en la producción de esteroides (p. ej., *Mycobacterium fortuitum*) son clasificadas como patógenos humanos (Nguyen *et al.*, 2011) y por tanto, su manejo requiere de medidas de bioseguridad adicionales.

- **Genoma secuenciado. Disponibilidad de múltiples herramientas de manipulación genética:**

El genoma de esta bacteria fue secuenciado en 2006 como parte de un proyecto internacional de secuenciación de genomas (NCBI Genome Project) (RefSeq: NC_008596.1). Por otra parte, *M. smegmatis* ha sido utilizada en las últimas décadas como micobacteria modelo en múltiples investigaciones básicas, lo que ha contribuido al desarrollo de múltiples herramientas que facilitan su rápida manipulación genética (p. ej., vectores suicida, vectores de expresión y *recombineering*) (p.ej., Stover *et al.*, 1991; Jackson *et al.*, 2001; Murphy *et al.*, 2015). Ambos aspectos son esenciales para la implementación con éxito de aproximaciones de Ingeniería Metabólica y deben ser considerados durante la selección de biofactorías celulares potenciales.

- **Micobacteria de crecimiento rápido:**

Esta bacteria presenta un crecimiento relativamente rápido en medios de cultivos baratos (p.ej., μ_{\max} (glicerol): 0,24 h⁻¹; μ_{\max} (glucosa): 0,32 h⁻¹; μ_{\max} (arabinosa): 0,27 h⁻¹; μ_{\max} (xilosa): 0,22 h⁻¹; Titgemeyer *et al.*, 2007) y no tiene requerimientos nutricionales complejos en comparación con otras actinobacterias.

- **Bacteria modelo de catabolismo de esteroides**

El hecho de que *M. smegmatis* haya sido utilizada como modelo de estudio del catabolismo aeróbico del colesterol (García *et al.*, 2012), simplifica notablemente las estrategias de diseño racional de mutantes para la producción de intermediarios esteroideos de interés. Por otra parte, la existencia de una menor redundancia de genes de catabolismo de esteroides en comparación con otras bacterias modelo (p. ej. *R. jostii* RHA1 o *N. simplex*) (Ver Apartado 1.2.2., Resultados), facilita la construcción de cepas altamente productoras. También evita la realización de múltiples

manipulaciones genéticas para evadir la mineralización de determinados sustratos y/o productos esteroideos relevantes (p. ej., corticoesteroides, progesterona o esteroides C-19) (Felpeto-Santero, 2016; Apartado 1, Resultados). Por otro lado, la capacidad natural de esta bacteria de degradar compuestos esteroideos (p. ej., esteroides) le proporciona posiblemente una mayor tolerancia natural a concentraciones altas de sustratos y/o productos esteroideos (p.ej., >10 g/L de fitoesteroides; Galán *et al.*, 2017) y la capacidad de transportar eficazmente diversos sustratos y/o productos esteroideos (p. ej., esteroides, corticoesteroides, progesterona o esteroides C-19) (Galán *et al.*, 2017; Felpeto-Santero, 2016; ver Apartado 1).

El único posible inconveniente de utilizar *M. smegmatis* como biofactoría celular para la producción de esteroides, es la presencia de enzimas modificadoras de esteroides en la célula que puedan generar subproductos no deseados y reducir los rendimientos de conversión. En principio, se podría pensar que estas actividades enzimáticas no están presentes en biofactorías celulares que no degradan esteroides (p. ej., *E. coli*, *B. subtilis* o *S. cerevisiae*). Sin embargo, existen numerosos ejemplos disponibles de microorganismos no degradadores que modifican determinados esteroides mediante mecanismos no siempre conocidos (p. ej., actividad 17 β -HSD de *S. cerevisiae*; Ward y Young, 1990; Długoński y Wilmańska, 1998). Por tanto, *a priori*, no resulta evidente que los microorganismos no degradadores de esteroides no presenten actividades enzimáticas inespecíficas que puedan actuar sobre los sustratos y/o productos esteroideos.

2.1. Ingeniería metabólica de la ruta catabólica de esteroides para la producción de intermediarios esteroideos de interés industrial

2.1.1. Producción de AD, ADD y 9OH-AD

2.1.1.1. *Mycobacterium* sp.

En la presente Tesis Doctoral y en otros trabajos llevados a cabo en este grupo (Galán *et al.*, 2017), se ha demostrado que es posible diseñar mediante aproximaciones de Ingeniería Metabólica cepas de *M. smegmatis* productoras de intermediarios esteroideos de interés (p. ej., AD, ADD, 9OH-AD) a partir de esteroides (Fig. 38). Como primera etapa en el diseño racional de las cepas, se anotaron por análisis *in silico* los genes *ksh* (*kshA/kshB*) y *kstD* involucrados en el catabolismo del colesterol en *M. smegmatis* mc²155. Para ello, primeramente, se identificaron las enzimas KshA, KshB y KstD anotadas en el genoma de *M. smegmatis* utilizando como referencia la secuencias de las proteínas previamente identificadas en *R. jostii* y *M. tuberculosis* (van der Geize *et al.*, 2007; Knol *et al.*, 2008; Cpyk *et al.*, 2009b), (Tabla 12). A continuación, se analizó la inducción en presencia de colesterol de los genes candidatos identificados y la presencia de posibles secuencias operadoras KstR en sus regiones promotoras (Tabla 12) (Kendall *et al.*, 2007; Uhía *et al.*, 2012). Como resultado de estos análisis *in silico*, se identificaron los genes *MSMEG_6039* (*kshB1*), *MSMEG_5925* (*kshA1*) y *MSMEG_5941* (*kstD1*) como principales candidatos involucrados en el catabolismo de esteroides en *M. smegmatis*.

Sobre la base de estos resultados, en primer lugar, se diseñó un mutante de delección génica $\Delta kshB1$ denominado MS6039 ($\Delta MSMEG_6039$) que producía eficientemente ADD a partir de esteroides (Galán *et al.*, 2017). La delección del gen *kshB1* imposibilitó el crecimiento de este mutante en esteroides como única fuente de carbono y energía (Fig. 21), sugiriendo que la enzima KshB1 es el único componente reductasa del sistema 9 α -hidroxilasa (KSH) involucrado en el catabolismo de esteroides en *M. smegmatis*. Por tanto, a diferencia de otras etapas enzimáticas del catabolismo de esteroides en esta

bacteria en las que intervienen múltiples isoenzimas (p. ej., 3 β -deshidrogenación y oxidación del C-26 de la cadena lateral) (Uhía *et al.*, 2011a; García-Fernández *et al.*, 2013), la actividad reductasa KshB no es redundante ni puede ser reemplazada por enzimas similares presentes en la célula. En la misma línea de estos resultados, la delección del gen *kshB* en la cepa *R. equi* USA-16 también llevó a la acumulación de ADD a partir de colesterol (Yeh *et al.*, 2014). El gen *kshB1* de *M. smegmatis* parece no estar involucrado y/o no ser esencial en la degradación de la cadena lateral de esteroides como fue sugerido previamente en un mutante equivalente de *R. erythropolis* str. SQ1 (van der Geize *et al.*, 2002a), que acumulaba sitostenona desde β -sitosterol y era incapaz de degradar la cadena lateral.

En segundo lugar, en esta Tesis Doctoral se construyó un mutante de delección génica $\Delta kstD1$ denominado MS5941 ($\Delta MSMEG_5941$), que fue incapaz de crecer eficientemente en esteroides como única fuente de carbono y energía (Fig. 39) y, que acumulaba mayoritariamente 9OH-AD a partir de colesterol (Fig. 40A). La construcción de este mutante permitió confirmar el papel esencial del gen *kstD1* en el catabolismo del esteroides en *M. smegmatis*, que había sido previamente sugerido por Brozstek *et al.* (2005). Sin embargo, la cepa mutante *M. smegmatis* $\Delta ksdD-1$ ($\Delta MSMEG_5941$) diseñada por estos autores acumulaba mayoritariamente AD a partir de colesterol (en lugar de 9OH-AD) y no producía otros intermediarios C-22 o C-24. Estos compuestos son detectados como subproductos de la biotransformación de esteroides en otras cepas de *Mycobacterium* sp. productoras de 9OH-AD (Donova *et al.*, 2005a; Yao *et al.*, 2014) y probablemente, son equivalentes a los intermediarios desconocidos detectados en los cultivos de la cepa MS5941 (Fig. 40B). Las diferencias fenotípicas observadas entre las cepas de *M. smegmatis* MS5941 y $\Delta ksdD-1$ pueden estar asociadas a múltiples factores (p. ej., condiciones de cultivo o diseño de la delección génica) y no son fácilmente discernibles.

En tercer lugar, se diseñó un mutante doble de delección génica de *M. smegmatis* mc²155 denominado MS6039-5941 ($\Delta kshB1$, $\Delta kstD1$) que producía eficientemente AD a partir de esteroides (Galán *et al.*, 2017). Este mutante también acumulaba pequeñas cantidades del intermediario ADD, que sólo eran detectables en presencia de concentraciones grandes de esteroides (Felpeto-Santero, 2016). Esta observación indicaba que al menos una de las enzimas KstD anotadas en el genoma de *M. smegmatis*, era capaz de reemplazar levemente la función de KstD1. Aunque esta actividad no parece cumplir un papel relevante en la degradación de colesterol, la existencia de actividades residuales KstD pueden estar reduciendo los rendimientos de conversión de las cepas MS5941 y MS6039-5941. Durante el transcurso de este trabajo, Yao *et al.* (2014) demostraron que dos actividades enzimáticas residuales KstD (KstD2 y KstD3) presentes en el mutante Mut_{MN-kstD1} ($\Delta kstD1$) de *M. neoaurum* ATCC 25795 disminuían notablemente la conversión de 9OH-AD a partir de esteroides. En este sentido, la utilización de las cepas Mut_{MN-kstD1&3} ($\Delta kstD1\Delta kstD3$) y/o Mut_{MN-kstD1&2&3} ($\Delta kstD1\Delta kstD2\Delta kstD3$) mejoró significativamente los rendimientos del proceso productivo (1,5 veces). Mediante análisis *in silico*, se ha comprobado que las enzimas KstD2 y KstD3 de *M. neoaurum* ATCC 25795 son ortólogas de las proteínas KstD2 (*MSMEG_2869*) y KstD3 (*MSMEG_2867*) de *M. smegmatis*, respectivamente. Por tanto, se podría asumir que si se delecionan los genes *MSMEG_2869* y/o *MSMEG_2867* en la cepa MS5941, se mejorarán notablemente los rendimientos de producción de 9OH-AD a partir de esteroides. Del mismo modo, se podría asumir que si se delecionan estos genes en la cepa MS6039-5941 se mejorará la selectividad de la biotransformación, evitando la acumulación de ADD y facilitando las etapas de purificación del producto (AD).

2.1.1.2. Otras actinobacterias: *Rhodococcus* sp.

En los últimos años se han identificado diferencias significativas en el catabolismo de esteroides en los distintos representantes del filo Actinobacterias, como por ejemplo entre determinadas especies de los géneros *Mycobacterium* y *Rhodococcus*.

En algunas especies del género *Rhodococcus* existen redundancias en los genes clave involucrados en el catabolismo de esteroides (p. ej., *kstD*, *kshA* o *kshB*), que dificultan considerablemente el diseño de mutantes productores de intermediarios esteroideos a partir de esteroides (van der Geize *et al.*, 2000, 2002, 2008; Wilbrink *et al.*, 2011; Fernández de las Heras *et al.*, 2012). Por ejemplo, en la bacteria *R. rhodochrous* DSM43269 fue necesaria la delección de cinco genes *kshA* para la construcción de una cepa mutante incapaz de mineralizar esteroides (Petrusma *et al.*, 2011). De la misma manera, en *R. ruber* str. Chol-4 fue necesario deleccionar dos genes *kstD* para evitar la mineralización de colesterol (Fernández de las Heras *et al.*, 2012). Por el contrario, en especies del género *Mycobacterium* como por ejemplo *M. smegmatis*, *M. tuberculosis* o *M. neoaurum*, la delección de un único gen (*kshA*, *kshB* o *kstD*) parece ser suficiente para impedir la mineralización eficiente de esteroides (Brozstek *et al.*, 2005; Andor *et al.*, 2006; Brozstek *et al.*, 2009; Capyk *et al.*, 2009b; Yao *et al.*, 2014; Galán *et al.*, 2017).

Por otro lado, los mutantes equivalentes del género *Mycobacterium* y *Rhodococcus* generan distintos tipos y/o cantidades de intermediarios esteroideos a partir de esteroides. Por ejemplo, las cepas de micobacterias productoras de AD/ADD acumulan en el cultivo los alcoholes 22-hidroxi-23,24-bisnorcol-4-en-3-ona (4-HBC) y/o 22-hidroxi-23,24-bisnorcol-1,4-dien-3-ona (1,4-HBC) (Marsheck *et al.*, 1972; Xu *et al.*, 2016; Galán *et al.*, 2017), mientras que los mutantes equivalentes de *Rhodococcus* acumulan en su lugar los derivados ácidos 3-oxo-23,24-bisnorcola-4-en-22-oico (4-BNC) y 3-oxo-23,24-bisnorcola-1,4-dien-22-oico (1,4-BNC) (Wilbrink *et al.*, 2011; Yeh *et al.*, 2014). En este sentido, el alcohol 4-HBC fue detectado hace muchos años durante la transformación de fitoesterol a AD llevada a cabo por la cepa industrial *Mycobacterium* sp. NRRL B-3805 (Marsheck *et al.*, 1972). En aquel momento, se postuló que este alcohol era un subproducto de biotransformación en lugar de un intermediario metabólico del catabolismo de esteroides (Marsheck *et al.*, 1972). Sin embargo, probablemente los alcoholes 4-HBC y/o 1,4-HBC se generan en una o dos etapas bioquímicas consecutivas a partir de los respectivos ácidos 4-BNC y 1,4-BNC. Las enzimas carboxil-reductasas que posiblemente catalizan estas reacciones, no han sido aún identificadas en micobacterias y, aparentemente no están presentes o son muy poco activas en *Rhodococcus*. Por otra parte, la acumulación de estos intermediarios C-22/C-24 es minoritaria en las especies de micobacterias, mientras que es significativamente mayor en los mutantes del género *Rhodococcus*. Por ejemplo, el mutante quintuple *kshA* de *R. rhodochrous* DSM43269 (cepa RG32) acumuló ADD y 1,4-BNC desde β -sitosterol con rendimientos molares del 6% y 67% (Wilbrink *et al.*, 2011), respectivamente, mientras que el mutante $\Delta kshB$ de *R. equi* USA-18 produjo ambos compuestos en ratios molares similares (Yeh *et al.*, 2014). En la misma línea, van der Geize *et al.*, (2002a) describieron un mutante $\Delta kshB$ de *R. erythropolis* str. SQ1 que perdió la capacidad de degradar la cadena lateral de los esteroides. Estos fenotipos se pueden explicar si se asume que la 9 α -hidroxilación juega un papel crítico en la actividad de determinadas enzimas involucradas en la degradación de la cadena lateral y que en el caso del género *Mycobacterium*, las enzimas homólogas son suficientemente eficientes sobre sustratos no hidroxilados como para que se acumulen mayoritariamente intermediarios C-19.

2.1.2. Producción de testosterona

En la presente Tesis Doctoral y en otros trabajos llevados a cabo en este grupo (Felpeto-Santero, 2016), se ha demostrado que es posible canalizar el flujo metabólico del catabolismo de esteroides hacia la formación de nuevos productos que no forman parte del metabolismo celular en *M. smegmatis*. En este trabajo, como prueba de concepto se ha estudiado la producción de la hormona sexual testosterona (TS), que presenta gran interés farmacológico por sus efectos fisiológicos androgénicos y anabolizantes en vertebrados.

La producción industrial de TS se realiza actualmente por síntesis química a partir de AD (Fig. 43). En los últimos años se han tratado de implementar a nivel industrial distintos bioprocesos de producción de TS. La existencia de actividades enzimáticas 17-cetosteroide reductasas (17 β -HSD, E.C. 1.1.1.64) (Bogovich y Payne, 1980), que catalizan la reducción/oxidación dependiente de NAD(P)H/NAD(P)⁺ en la posición C-17 de diversos esteroides (p. ej., AD, TS), ha sido el punto de partida de todas estas investigaciones (Fig. 42). Se han identificado actividades enzimáticas 17 β -HSD en distintos organismos (p. ej., mamíferos, bacterias, levaduras, hongos filamentosos y plantas) (Peltoketo et al., 1999; Donova et al., 2005c; Moeller y Adamski, 2006, 2009; Marchais-Oberwinkler et al., 2011) y se han sobrexpresado diversos genes de 17 β -HSD en *E. coli* (Abalain et al., 1993; Rižner et al., 1999; Chang et al., 2010). En este sentido, la utilización de *E. coli* como biofactoría celular para la producción de TS probablemente no ha sido factible por el hecho de que esta bacteria no transporta eficientemente esteroides. Fogal et al. (2013) desarrollaron un proceso *in vitro* para la producción de TS a partir de AD utilizando una enzima 17 β -HSD recombinante de origen murino (isoenzima tipo V) y una enzima glucosa deshidrogenasa que regeneraba el cofactor consumido en la reacción. Este proceso presentaba buenos rendimientos de conversión, pero tenía un alto coste debido a la necesidad de producir y purificar las enzimas recombinantes en *E. coli*. Otros autores han utilizado micobacterias aisladas del medio ambiente u obtenidas por métodos de mutagénesis clásica para producir TS por fermentación directa a partir de esteroides (Wang et al., 1982; Hung et al., 1994; Liu et al., 1994; Llanes et al., 1995; Liu and Lo, 1997; Borrego et al., 2000; Lo et al., 2002; Mei et al., 2005; Egorova et al., 2009). En estas micobacterias, la testosterona se genera por la acción de actividades enzimáticas 17 β -HSDs a partir de AD/ADD cuando dichos compuestos se hiperproducen y/o se acumulan en los procesos de fermentación. En el caso del intermediario ADD, la actividad enzimática de una proteína 17 β -HSD y una KstD se combina para la producción de TS (Wang et al., 1982; Egorova et al., 2009). Estos procesos tampoco han sido implementados a nivel industrial por las bajas eficiencias de conversión conseguidas y/o la presencia de subproductos que dificultan los procesos de purificación. Por otra parte, resulta curioso que, hasta el inicio de este trabajo, no se hayan explorado la aplicación de aproximaciones de Ingeniería metabólica para la producción de TS.

Con el objetivo de biotransformar eficientemente esteroides naturales (fitoesteroides o colesterol) y/o AD en TS, se diseñaron cepas recombinantes de *M. smegmatis* que sobreexpresaran genes de 17 β -HSD. Es importante resaltar una vez más que, otras bacterias silvestres que metabolizan esteroides y que son capaces de transportar AD y TS (por ejemplo, *Comamonas*, *Rhodococcus* or *Gordonia*), no pueden ser utilizadas en principio para este propósito porque son capaces de degradar eficientemente esteroides C-19. (Tamaoka et al., 1987; Cabrera et al., 2000; Fernández de las Heras et al., 2009; Li et al., 2014). Por otra parte, y a diferencia de lo observado en otras especies de micobacterias (Wang et al., 1982; Smith et al., 1993; Egorova et al., 2002a), cuando la cepa silvestre *M. smegmatis* mc²155 y las distintas cepas mutantes productoras de intermediarios esteroideos C-19 (cepas MS6039-5941, MS5941y MS6039) se cultivaron en presencia de fitoesteroides o colesterol, no se detectó TS como subproducto de

la fermentación (Galán *et al.*, 2017; Apartado 2.1., Resultados). Durante el curso de este trabajo, Dlugovitzky *et al.* (2015) mostraron que *M. smegmatis* PTCC 1307 produce testosterona y ciertos estrógenos a partir de precursores tritiados, lo que sugiere de la existencia de una actividad enzimática 17 β -HSD en esta bacteria. Sin embargo, nuestros resultados sugieren que *M. smegmatis* mc²155 no presenta un gen de la 17 β -HSD funcional o al menos este gen no se induce en nuestras condiciones de ensayo.

Hasta el momento no se han identificado los genes de la 17 β -HSD descritos en otras especies de micobacterias y sólo en algunos casos se han purificado y caracterizado parcialmente las proteínas que codifican (Goren *et al.*, 1983; Egorova *et al.*, 2002b, 2005), por lo que no es posible mediante análisis *in silico* identificar y anotar fácilmente los genes que codifican estas actividades enzimáticas. Recientemente se ha demostrado mediante ensayos *in vitro* que la proteína Hsd4A de *M. neoaurum* ATCC 25795 presenta doble actividad enzimática: 17 β -HSD y β -hidroxiacil-CoA deshidrogenasa (Xu *et al.*, 2016). La actividad 17 β -HSD de esta proteína no es reversible en condiciones *in vitro* (sólo transforma TS en AD) y en principio, parece no ser la responsable de la producción de TS a partir de AD en micobacterias. Con el objetivo de identificar otros genes de las 17 β -HSD candidatos para nuestro propósito de expresión heteróloga, se realizó un análisis bibliográfico detallado. Teniendo en cuenta que como norma general la producción heteróloga de proteínas en bacterias es más exitosa cuando se seleccionan proteínas de origen microbiano (Fernández y Vega, 2016), se decidió trabajar en la identificación de enzimas 17 β -HSDs microbianas. En este sentido, en los últimos años se han caracterizado con gran detalle las enzimas 17 β -HSDs de la bacteria *C. testosteroni* (Schultz *et al.*, 1977; Lefebvre *et al.*, 1979; Minard *et al.*, 1985; Genti-Raimondi *et al.*, 1991; Yin *et al.*, 1991; Abalain *et al.*, 1993; Benach *et al.*, 1996; Oppermann *et al.*, 1997; Cabrera *et al.*, 2000; Benach *et al.*, 2002) y del hongo *C. lunatus* (Plemenitas *et al.*, 1988; Rižner *et al.*, 1996, 1999, 2000; Rižner y Zakelj-Mavric, 2000; Zorko *et al.*, 2000; Rižner *et al.*, 2001a, b; Kristan *et al.*, 2003, 2005; Cassetta *et al.*, 2005; Ulrih y Rižner, 2006; Kristan *et al.*, 2007a, b; Brunskole *et al.*, 2009; Sveglj *et al.*, 2012). Curiosamente, ambas proteínas presentan una identidad de secuencia baja a pesar de tener la misma actividad biológica. Por ello, en este trabajo se realizaron análisis *in silico* utilizando como referencia ambas secuencias proteicas con el propósito de identificar en las bases de datos 17 β -HSDs homólogas en *M. smegmatis* y en otras micobacterias en las que se han descrito actividades 17 β -HSD (p. ej., *M. neoaurum*). No fue posible identificar ninguna proteína candidata, puesto que las identidades de secuencia encontradas en todos los casos fueron menores del 40% y analizando el contexto genómico no se encontró ninguna relación significativa con catabolismo de esteroides. Por otra parte, también resultó curioso comprobar que diversos representantes del filo Ascomycota (en el que se incluye *C. lunatus*) en los que se han descrito actividades 17 β -HSDs como por ejemplo *S. cerevisiae* (Ward y Young, 1990; Długoński y Wilmańska, 1998), únicamente presentan proteínas con identidades de secuencias bajas con la 17 β -HSD de *C. lunatus*. Por todo ello, estos estudios *in silico* demostraron que no resulta sencillo establecer una correlación directa entre identidad de secuencia y actividad 17 β -HSD, ni tampoco asignar una función biológica de estas proteínas en los organismos nativos. Esta observación ha sido ya descrita en vertebrados que presentan varias isoenzimas 17 β -HSDs con identidades de secuencias generalmente pequeñas (15-20%) (Moeller y Adamski, 2009). En función de estos resultados, se decidió seleccionar los genes de las 17 β -HSD de *C. testosteroni* y *C. lunatus* como opción más segura para su expresión heteróloga en *M. smegmatis*. Ambos genes fueron sobreexpresados establemente tanto en la cepa silvestre de *M. smegmatis* mc² 155 como en la cepa mutante *M. smegmatis* MS6039-5941 productora de AD.

En primer lugar, se investigó la producción de TS a partir AD en biotransformaciones en *resting-cell* utilizando las cepas recombinantes de *M. smegmatis* mc² 155 (ver Apartado 2.2.2., Resultados). En estos ensayos se verificó la funcionalidad de las enzimas heterólogas y se observó que el estado redox celular (p. ej., ratio intracelular de NAD(P)/NAD(P)H) juega un papel clave en la producción de TS. Nuestros resultados sugerían que era necesario añadir una fuente de carbono al medio de reacción para regenerar el poder reductor en forma de NAD(P)H que se consume en la reducción de AD a TS (Fig. 44). En este sentido, diversos autores ya habían demostrado que la adición de fuentes de carbono y el pH de la reacción son factores importantes para la producción de TS, ya que determinan la dirección del equilibrio de la reacción enzimática (Liu *et al.*, 1994; Llanes *et al.*, 1995; Liu *et al.*, 1997; Egorova *et al.*, 2009).

A continuación, se investigó la producción de TS a partir de esteroides en biotransformaciones en crecimiento utilizando las cepas recombinantes de *M. smegmatis* MS6039-5941 (ver Apartado 2.2.3., Resultados). Estos experimentos confirmaron de nuevo la importancia del estado metabólico celular en la producción exitosa de TS. La energía que las células obtienen de la degradación de la cadena lateral del colesterol parece no ser suficiente para la reducción de AD en TS (Fig. 45) y sólo se consiguieron rendimientos de TS notables cuando se añadió al medio de cultivo fuentes de carbono alternativa (p. ej., glucosa o glicerol). Por otra parte, se demostró que la producción de TS a partir de esteroides es más eficiente en la cepa recombinante que sobreexpresa el gen de la 17 β -HSD fúngica (Fig. 46). Aunque para la producción de TS en ambas cepas fue necesaria la adición de una fuente de carbono, la reconversión de TS a AD no fue observada en el caso de esta cepa. La reversibilidad de las enzimas 17 β -HSD fue previamente descrita en mutantes convencionales de micobacterias (Liu y Lo, 1997). Nuestra observación probablemente se puede explicar por el hecho de que el equilibrio de reacción de la proteína fúngica está más desplazado hacia la producción de TS (reducción), mientras que en el caso de la proteína bacteriana está más desplazado hacia el consumo de TS (oxidación) (Genti-Raimondi *et al.*, 1991; Cabrera *et al.*, 2000). También puede ser relevante el hecho de que la enzima fúngica utiliza NADPH como coenzima para la reducción de AD y no presenta preferencias entre NAD⁺/NADP⁺ para la oxidación de TS (Rižner y Zakelj-Mavric, 2000) y, la enzima bacteriana utiliza NAD(H) como cofactor para ambas reacciones. En cualquier caso, estas diferencias catalíticas pueden ser claves para el éxito del proceso y pueden estar relacionadas con las distintas funciones biológicas de las proteínas 17 β -HSDs en los organismos nativos. La proteína 17 β -HSD de *C. testosteronei* interviene en el catabolismo de TS (Genti-Raimondi *et al.*, 1991), mientras que el papel biológico de la enzima 17 β -HSD fúngica no está claro (Rižner *et al.*, 2001b). En relación a este último aspecto, diversos autores han demostrado que ciertas hormonas esteroideas presentan actividad antifúngica y han postulado que la introducción de distintas modificaciones en las moléculas esteroideas (p. ej., 17 β -deshidrogenación) sirve como mecanismo de detoxificación (Długoński y Wilmańska 1998; Cvelbar *et al.*, 2013).

Las cepas recombinantes fueron capaces de producir TS a partir de AD y/o esteroides con rendimientos altos, que son comparables a los datos previamente publicados utilizando mutantes de micobacterias obtenidos por procedimientos mutagénicos clásicos (Liu *et al.*, 1994; 1997). Sin embargo, la implementación de un bioproceso industrial de producción de TS a partir de esteroides en una única etapa de fermentación necesita incorporar mejoras considerables. Teniendo en cuenta que la reversibilidad de las enzimas 17 β -HSD y el estado metabólico celular son dos factores limitantes del proceso, resulta lógico orientar los esfuerzos futuros en la optimización de los mismos. Para optimizar el primero de estos factores, será importante identificar enzimas 17 β -HSD no reversibles en otros organismos y/o modificar las enzimas ya caracterizadas mediante técnicas de ingeniería de proteínas. En esta línea, ya se han diseñado distintas versiones de las proteínas 17 β -HSD de *C. testosteronei* y *C.*

lunatus que presentan en ensayos *in vitro* propiedades catalíticas distintas en cuanto a especificidad de sustrato, requerimientos de coenzima o actividad catalítica (Oppermann *et al.*, 1997; Kristan *et al.*, 2003, 2005, 2007; Brunskole *et al.*, 2009; Svegelj *et al.*, 2012). La aplicación de aproximaciones de tecnología de ADN recombinante ofrece una mayor versatilidad que los métodos de mutagénesis convencional, permitiendo explorar la utilización de enzimas 17 β -HSD heterólogas de distintos orígenes y con distintas propiedades catalíticas. En este sentido, nuestros resultados apoyan la elección de la enzima fúngica como mejor candidata para generar cepas recombinantes para la producción de TS a partir de esteroides. Para controlar el segundo de estos factores, resultará vital comprender el metabolismo bacteriano (p. ej., estado redox celular). En esta Tesis Doctoral y en otros trabajos previos (Liu *et al.*, 1994; Llanes *et al.*, 1995; Liu *et al.*, 1997; Egorova *et al.*, 2009), se ha demostrado que la adición de fuentes de carbono alternativas, el pH del medio o la modalidad de adición del sustrato son determinantes para desplazar el equilibrio de reacción hacia la formación de TS a partir de AD. Sin embargo, en estos experimentos el proceso se ha tratado como una caja negra en la que sólo se ha considerado lo que entraba o lo que salía de ella y en ningún caso, lo que ocurría dentro de la misma. La incorporación de aproximaciones de Biología de Sistemas podría proporcionar una información más detallada sobre el metabolismo microbiano durante el proceso productivo y por tanto, de cómo modificarlo a la voluntad para incrementar los rendimientos.

2.2. Otras modificaciones esteroideas de relevancia industrial

A lo largo de esta Tesis Doctoral, se han enumerado varios ejemplos de isoenzimas en las rutas catabólicas de esteroides de actinobacterias. Por un lado, se han mencionado ejemplos de isoenzimas que participan en la misma etapa enzimática de una ruta catabólica dada. Este es el caso de las enzimas 3 β -deshidrogenasas y los citocromos P450 que actúan en la degradación del colesterol en *M. smegmatis* (Uhía *et al.*, 2011a; García-Fernández *et al.*, 2013). Por otro lado, se han dado ejemplos de isoenzimas que presentan la misma actividad enzimática pero participan en distintas rutas catabólicas, ya que se expresan en condiciones diferenciales y/o presentan especificidades de sustrato diferentes. Este es el caso de las enzimas KstD, KshA y KshB descritas en *M. smegmatis* en esta Tesis Doctoral.

El hecho de que varias proteínas con una misma actividad enzimática presenten especificidades de sustrato diferentes u otras propiedades cinéticas distintas (mecanismo catalítico, estabilidad proteica, etc.), es importante y puede resultar determinante para el éxito o el fracaso de un proceso biotecnológico particular. Sorprendentemente, este criterio no se ha tenido en cuenta en el diseño de biotransformaciones microbianas de esteroides. Por ello, en este trabajo, se ha explorado este aspecto utilizando las reacciones de Δ 1,2-deshidrogenación y 9 α -hidroxilación de 3-cetoesteroides como pruebas de concepto.

2.2.1. Δ 1,2-deshidrogenación de 3-cetoesteroides

Las reacciones enzimáticas de Δ 1,2-deshidrogenación de 3-cetoesteroides presentan un gran atractivo para la industria farmacéutica por su relevancia en distintos procesos productivos. Determinados glucocorticoides sintéticos de interés clínico como por ejemplo la prednisona y la prednisolona son sintetizados mediante reacciones de Δ 1,2-deshidrogenación a partir de los precursores naturales hidrogenados (cortisona e hidrocortisona, respectivamente). (Fig. 49). La deshidrogenación entre los carbonos C-1 y C-2 está asociada a un incremento importante de la actividad antiinflamatoria de estas

moléculas y una reducción considerable de sus efectos secundarios. En la actualidad, esta modificación química se efectúa a nivel industrial en procesos de biotransformación que utilizan microorganismos salvajes con actividades enzimáticas KstD constitutivas o inducibles como por ejemplo la bacteria *A. simplex* o *N. simplex* (Zhang *et al.*, 1998; Shtratnikova *et al.*, 2016). Recientemente, Zhang *et al.*, (2013a) desarrollaron una estrategia genética para incrementar los niveles de actividad enzimática KstD en la bacteria *A. simplex* 156 que llevaron a mejoras significativas en el rendimiento del proceso.

Por otro lado, la producción selectiva de ADD en una única etapa de fermentación a partir de esteroides continúa siendo uno reto para la industria de esteroides. Hasta el momento, todas las cepas de micobacterias aisladas/diseñadas acumulan mezclas de los intermediarios AD/ADD en distintas proporciones en condiciones de producción industrial, lo que dificulta las etapas posteriores de purificación de producto (Marheck *et al.*, 1972; Wei *et al.*, 2010a; Galán *et al.*, 2017). Con el objetivo de lograr bioconversiones próximas al 100%, la síntesis industrial de ADD se suele llevar a cabo en dos etapas de fermentación consecutivas: (i) producción de AD/ADD a partir de fitoesteroides con mutantes de *Mycobacterium* sp., (ii) bioconversión del AD residual en ADD en *resting-cell* con cepas de *A. simplex*. En las últimas décadas, se han planteado diversas hipótesis acerca de la imposibilidad de conseguir bioconversiones completas a partir de esteroides con las cepas de micobacterias: (i) existencia de actividades 1-eno reductasas que efectúan la reacción enzimática reversa (Goren *et al.*, 1983; Egorova *et al.*, 2002b), (ii) fenómenos de inhibición y/o toxicidad asociada a la acumulación de ADD (Smith *et al.*, 1993), (iii) niveles insuficientes de actividad enzimática KstD (Wei *et al.*, 2014). En línea con esta última hipótesis, varios autores han sobreexpresado genes *kstD* endógenos/heterólogos en cepas productoras de ADD logrando mejoras notables en los procesos, pero en ningún caso consiguiendo bioconversiones completas (Wei *et al.*, 2010b, 2014). Por este motivo, en los últimos años también se han desarrollado biofactorías celulares que sobreexpresan genes *kstD* (Li *et al.*, 2007; Zhang *et al.*, 2013b; Shao *et al.*, 2017), que podrían ser utilizadas como alternativa a las cepas silvestres de *A. simplex*.

Como punto de partida para la mejora de los bioprocesos industriales arriba mencionados, en este trabajo se desarrollaron varias cepas recombinantes de *M. smegmatis* que sobreexpresaban genes *kstD* endógenos (*kstD1*, *kstD2* o *kstD3*) o genes *kstD* heterólogos procedentes de la bacteria *R. ruber* str. Chol-4 (*kstD1r* y *kstD2r*). En biotransformaciones en *resting-cell*, se comprobó que todas las cepas recombinantes eran capaces de Δ 1,2-deshidrogenar los sustratos AD y cortisona. Sin embargo, se observaron diferencias significativas en la eficacia de biotransformación de los distintos catalizadores. Las cepas que sobreexpresaban los genes *kstD1*, *kstD2* y *kstD2r* fueron los biocatalizadores más eficientes en la conversión de AD en ADD (Fig. 52A), mientras que la cepa que sobreexpresaba el gen *kstD2* fue el biocatalizador más eficiente en la conversión de cortisona en prednisona (Fig. 52B). Las diferencias observadas en las eficiencias catalíticas de las cepas recombinantes probablemente están relacionadas con las propiedades catalíticas (p.ej., especificidad de sustrato) y/o estructurales (p.ej., dominios de anclaje a membrana) características de cada proteína. En este sentido, la enzima KstD2 y su ortóloga KstD2r participan en el catabolismo de esteroides C-19, por lo que resulta razonable observar que presentan una mayor especificidad por los sustratos C-19 que otras enzimas KstDs. La enzima KstD1 también parece ser capaz de Δ 1,2-deshidrogenar eficientemente el AD en condiciones de sobreexpresión génica, aunque nuestros resultados previos con el mutante Δ *kstR* sugieren que KstD1 no es un catalizador tan eficiente sobre este sustrato. En el lado opuesto, la enzima KstD1r de *R. ruber*, que está involucrada en el catabolismo del colato, y su posible ortólogo KstD3, no son catalizadores enzimáticos tan eficientes para estos sustratos.

Sobre la base de estos datos, las cepas recombinantes que sobreexpresan los genes *kstD2* o *kstD2r* son probablemente los biocatalizadores más eficientes para la bioconversión de AD en ADD. Estas cepas o versiones mejoradas de las mismas, podrían ser utilizadas como alternativa a las cepas silvestres de *A. simplex*. La clonación de uno de estos genes en la cepa mutante MS6039, también podría mejorar notablemente la selectividad del proceso de producción de ADD a partir de esteroides en condiciones de producción industrial. Tradicionalmente se han sobreexpresado los genes *kstD* involucrados en el catabolismo de esteroides para este propósito (Wei *et al.*, 2010b, 2014). Sin embargo, los datos presentados en esta Tesis Doctoral sugieren que las KstDs involucradas en el catabolismo de esteroides C-19 probablemente son mejores candidatas para este propósito. Como alternativa a esta estrategia, se podría llevar a cabo la co-expresión del gen *kstD1* y del gen *kstD2* (o *kstD2r*) con el objetivo de favorecer que las reacciones de $\Delta 1,2$ -deshidrogenación tengan lugar en distintas etapas (sobre distintos sustratos) del catabolismo de esteroides como se ilustra en la Fig. 59.

Dado que no se pueden descartar la influencia de otros factores en la eficacia catalítica de los biocatalizadores (p. ej., cantidad de enzima KstD activa en cada cepa recombinante), las conclusiones planteadas más arriba deben ser tomadas con cautela. Por otra parte, dado que no se consiguen hiperproducciones de proteínas recombinantes en *Mycobacterium* cuando se utiliza el vector de expresión pMV261 (Fig. 53), puede ser interesante aumentar la concentración de enzima recombinante intracelular con el propósito de mejorar la velocidad de las biotransformaciones. Para ello, será necesario identificar nuevos promotores más fuertes y diseñar nuevos vectores de expresión.

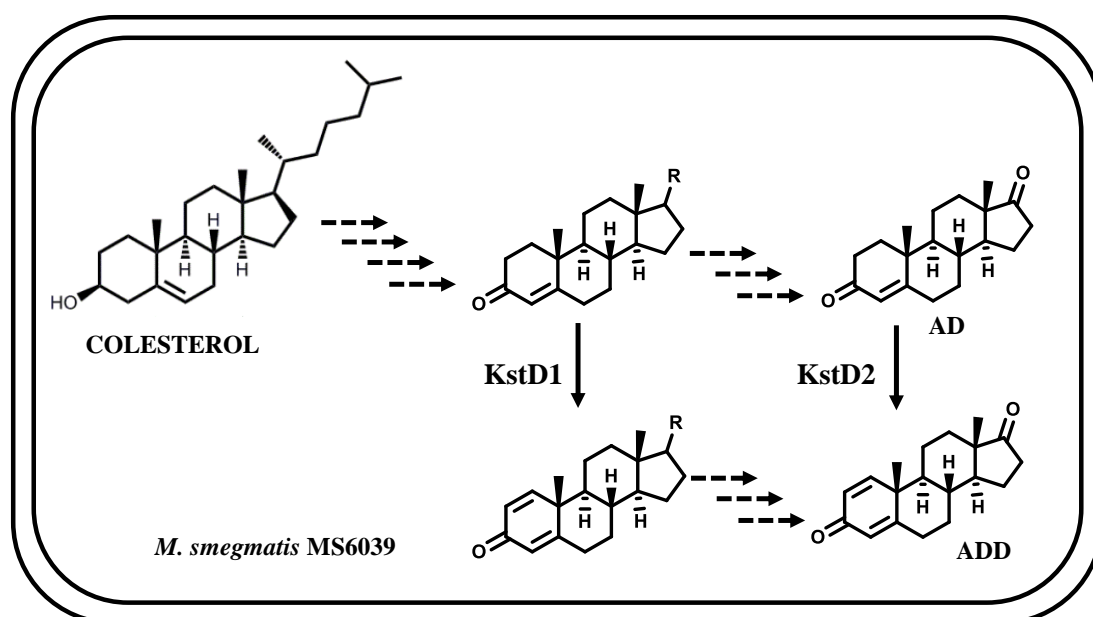


Figura 59. Representación esquemática de un proceso alternativo para la síntesis de ADD. Se ilustra un proceso más selectivo para la producción de ADD a partir de esteroides que utiliza una cepa mutante de *M. smegmatis* MS6039 ($\Delta kshB1$) que sobreexpresa los genes *kstD1* (MSMEG_5941) y *kstD2* (MSMEG_2869). Las enzimas KstD1 y KstD2 catalizan la $\Delta 1,2$ -deshidrogenación de 3-cetoesteroides en distintas etapas (sobre distintos sustratos) del catabolismo de esteroides.

2.2.2. 9 α -Hidroxilación de 3-cetoesteroides

La 9 α -hidroxilación de 3-cetoesteroides presenta un gran interés industrial, ya que ciertas moléculas esteroideas con un grupo OH en el C-9 (p. ej., 9OH-AD o 9OH-progesterona) son precursores de la síntesis química de corticoesteroides. Esta modificación química puede ser catalizada por distintas enzimas 3-cetoesteroide-9 α -hidroxilasas (KSH) (Petrusma *et al.*, 2014).

En este trabajo se desarrollaron dos cepas recombinantes de *M. smegmatis* que sobreexpresaban los genes homólogos *kshA1* o *kshA2* de la bacteria y se comprobó que presentaban una capacidad diferencial de hidroxilar 3-cetoesteroides en biotransformaciones en *resting-cell*. La cepa recombinante que sobreexpresaba el gen *kshA2*, involucrado en el catabolismo de esteroides C-19, fue capaz de 9 α -hidroxilar eficientemente el AD/ADD (Fig. 54A, B). En cambio, sólo la cepa recombinante que sobreexpresaba el gen *kshA1*, involucrado en el catabolismo del colesterol, fue capaz de transformar eficientemente la progesterona en 9OH-progesterona (Fig. 54C). El gen *kshA1* ya había sido previamente sobreexpresado en cepas de *E. coli* para biotransformar AD o progesterona (Andor *et al.*, 2006; Arnell *et al.*, 2007). Sin embargo, estos bioprocesos fueron poco eficientes posiblemente por varios aspectos. En primer lugar, es posible que *E. coli* no sea una biofactoría celular óptima porque no transporta eficientemente esteroides. En segundo lugar, nuestros resultados indican que la proteína KshA1 no actúa eficientemente sobre el sustrato AD, por lo que para la producción de 9OH-AD sería recomendable la utilización de la enzima KshA2 u otras proteínas ortólogas.

Las enzimas KSH son monooxigenasas de dos componentes que constan de una oxigenasa terminal (KshA) y una ferredoxina reductasa (KshB) (E.C. 1.14.13.142) (Petrusma *et al.*, 2014). El componente KshA reconoce e hidroxila específicamente el sustrato, mientras que KshB transfiere el poder reductor requerido para la progresión de la reacción enzimática. La interacción proteica KshA/KshB parece no ser demasiado específica, ya que en los genomas de actinobacterias es posible encontrar un mayor número de genes *kshA* que de genes *kshB* en los *clusters* génicos de catabolismo de esteroides (p.ej., *R. jostii* RHA1, *N. simplex* VKM Ac-2033D o *G. neofelifaecis* NRRL B-59395). Este hecho sugiere que una misma proteína KshB puede interaccionar con varias KshAs o que incluso otras reductasas inespecíficas presentes en la célula pueden actuar como donadores de poder reductor. En este sentido, en nuestro trabajo se ha observado que la proteína KshB2 es capaz de suplir la función de KshB1 en el catabolismo de esteroides en *M. smegmatis* (al menos en condiciones de sobreexpresión). De la misma manera, Yuan *et al.* (2015) regeneraron una actividad enzimática KSH funcional en *Mycobacterium* sp. NRRL B-3805, utilizando el gen *kshA* de *M. smegmatis* mc²155 y el gen *kshB* de *G. neofelifaecis* NRRL B-59395. Por otra parte, en nuestro trabajo también se ha demostrado que no es esencial sobreexpresar un gen *kshB* para hidroxilar eficientemente 3-cetoesteroides en *M. smegmatis* en ensayos de *resting-cell*. Sin embargo, es probable que la co-expresión de un gen *kshB* incremente la velocidad específica de la reacción y por tanto, los rendimientos de conversión de los procesos. Recientemente, Zhang *et al.* (2016) demostraron que la co-expresión de los genes *kshA/kshB* de *M. neoaurum* con el gen *gdh* endógeno (glucosa 1-deshidrogenasa) en una cepa recombinante de *B. subtilis*, mejoró notablemente los rendimientos de la bioconversión. Por tanto, cualquier aproximación que promueva un aumento en el ratio NADH/NAD celular (p. ej., alteración de los flujos metabólicos mediante manipulación genética o utilización de fuentes de carbono alternativas), probablemente mejore también los rendimientos de las reacciones de 9 α -hidroxilación.

3. Retos actuales de la Biotecnología de Esteroides

Los orígenes de la Biotecnología de Esteroides son probablemente similares a los de otros procesos biotecnológicos clásicos, como por ejemplo la producción de aminoácidos o de antibióticos. Sin embargo, al realizar un análisis bibliográfico de la evolución histórica de los bioprocesos de síntesis de esteroides, es posible comprobar que las aproximaciones de Ingeniería Metabólica o de Biología de Sistemas que son frecuentemente utilizadas para la mejora de procesos biológicos (Nielsen y Keasling, 2016; Lee *et al.*, 2016; Silber *et al.*, 2016), no han sido apenas aplicadas en este campo. Este hecho se puede explicar en parte por las dificultades intrínsecas asociadas al manejo de esteroides (bajas solubilidades, toxicidades, etc.) y la difícil manipulación genética y mala reputación de las biofactorías celulares comúnmente usadas en estos procesos (micobacterias). A continuación se enumeran algunos de los retos a los que se enfrenta la Biotecnología de esteroides en distintos plazos temporales.

3.1. Retos a corto plazo

Los retos a corto plazo de la Biotecnología de Esteroides se alinean en un objetivo general que consiste en la construcción de una segunda generación de cepas de *Mycobacterium* sp. para la producción de intermediarios esteroideos de interés industrial a partir de esteroides. Aplicando los conocimientos adquiridos en los últimos años y las nuevas metodologías, es posible diseñar una nueva colección de cepas con “propiedades mejoradas” (p. ej., una nueva colección de cepas de *M. smegmatis* denominada *M. smegmatis* 2.0). A continuación, se explican brevemente los subobjetivos específicos que en el fondo definen las “propiedades” que deben ser mejoradas en las biofactorías celulares ya disponibles:

1. Logro de mayores eficiencias de conversión de esteroides (i. e., mayores cargas de sustrato).
2. Eliminación de actividades enzimáticas secundarias que actúan sobre los productos.
3. Introducción de mejoras en la selectividad de los procesos de producción.
4. Producción de una nueva gama de intermediarios esteroideos de interés.

A continuación, se enumeran algunas aproximaciones, tecnologías o tareas que podrían/deberían ser combinadas para lograr estos subobjetivos:

3.1.1. Secuenciación y anotación de genomas de cepas industriales

Los avances tecnológicos de las últimas décadas han permitido incrementar el rendimiento y reducir los tiempos y costes de obtención de datos de secuenciación de genomas. Por ello, una aproximación interesante es la secuenciación y anotación de genomas de cepas industriales (p. ej., *Mycobacterium* sp. NRRL B-3805, *Mycobacterium* sp. NRRL B- 3683 o *Mycobacterium* sp. VKM Ac-1815D). En la mayoría de los casos, estas cepas se han seleccionado después de largos procesos de mutagénesis convencional que han llevado a la creación de biofactorías celulares altamente productoras de intermediarios esteroideos a partir de esteroides. En este sentido, en los últimos años se ha publicado la secuenciación de los genomas de algunas cepas de micobacterias y se está trabajando en la identificación de las mutaciones responsables de los fenotipos de interés seleccionados (Bragin *et al.*, 2013; Shtratnikova *et al.*, 2014, 2015a; Rodríguez-García *et al.*, 2016). En la misma línea, se han secuenciado y anotado los genomas de otras cepas de interés utilizadas en otros procesos industriales como por ejemplo *N. simplex* VKM Ac-2033D (Shtratnikova *et al.*, 2015b, 2016).

3.1.2. Implementación de nuevas herramientas de edición genómica

En los últimos años se han realizado avances importantes en el desarrollo de herramientas de edición genómica (p. ej., *recombineering* o *recombineering* asistido por CRISPR-Cas9 (*clustered regularly interspaced short palindromic repeats- CRISPR associated protein 9*)), que facilitan la construcción de cepas bacterianas para distintos fines como por ejemplo las aplicaciones industriales de Biotecnología Blanca (Pines *et al.*, 2015; Jakočiūnas *et al.*, 2016). Estas herramientas posibilitan la introducción de múltiples modificaciones genómicas, acortando notablemente los tiempos de construcción de cepas y evitando el uso de marcadores de selección. En la actualidad, existe un sistema de *recombineering* disponible para la modificación genómica de micobacterias (Murphy *et al.*, 2015) y se ha implementado un sistema CRISPR-Cas9 de interferencia (CRISPRi) (Choudhary *et al.*, 2015), que abre la posibilidad de diseñar sistemas de edición de genomas aún más versátiles (p. ej., *recombineering* asistida por CRISPR-Cas9). En los próximos años también se deberán realizar esfuerzos adicionales para la construcción de librerías de promotores de distinta fuerza en micobacterias (Kanno *et al.*, 2016), así como el desarrollo de circuitos regulatorios que garanticen un control óptimo de la expresión de los genes heterólogos (Bradley *et al.*, 2016).

3.1.3. Descifrado de la complejidad del catabolismo de esteroides en actinobacterias modelo

A lo largo de esta Tesis Doctoral, se ha mencionado la existencia de redundancias génicas en muchas de las etapas clave del catabolismo de esteroides en actinobacterias. Un mayor entendimiento de esta complejidad catabólica puede ser clave para la optimización de la mayoría de bioprocesos industriales actuales de producción de intermediarios esteroideos a partir de esteroides. Por un lado, la degradación parcial de los productos observada en muchos procesos (p. ej., producción de 9OH-AD; Yao *et al.*, 2014) se podría evitar a través de la eliminación de actividades enzimáticas no deseadas vía delección génica racional. Por otro lado, la identificación de las proteínas involucradas en cada una de las etapas del catabolismo de esteroides puede resultar útil en la construcción de nuevas cepas productoras de intermediarios esteroideos (p. ej., 4-HBC, 1,4-HBC; Xu *et al.*, 2016). Estos conocimientos también pueden ser utilizados para la identificación de etapas limitantes que llevan a rendimientos de conversión bajos y/o a la acumulación de subproductos en los bioprocesos de producción disponibles, así como para la superación de las mismas vía sobreexpresión génica (p. ej., sobreexpresión de etapas limitantes de la degradación lateral de esteroides para evitar la acumulación de 4-HBC en cepas productoras de AD). En la misma línea, una mejor caracterización de la complejidad catabólica de esteroides es importante para la identificación de isoenzimas con distintas especificidades de sustrato que puedan ser utilizadas en la mejora de estos procesos. Por ejemplo, para la optimización de los procesos industriales de producción de ADD a partir de esteroides, se podrían utilizar otras enzimas KstD que presenten mayor afinidad por el AD (p. ej., KstD2, involucrada en el catabolismo de esteroides C-19) como alternativa a la sobreexpresión génica de *kstDs* involucradas en el catabolismo de esteroides.

3.1.4. Experimentos de evolución adaptativa en laboratorio para la mejora de fenotipos complejos

La Evolución Adaptativa en Laboratorio (*Adaptive Laboratory Evolution*, ALE) es una metodología frecuentemente utilizada para conocer los mecanismos básicos de la evolución molecular y

los cambios adaptativos acumulados en las poblaciones microbianas bajo condiciones específicas de crecimiento durante procesos de selección a largo plazo. Aunque esta metodología se ha aplicado de manera regular durante más de 25 años, la aparición de tecnologías de secuenciación de nueva generación han facilitado su implementación en numerosos procesos biotecnológicos en los últimos años (Dragosits y Mattanovich, 2013). Teniendo en cuenta la complejidad de las bases moleculares responsables de la hiperproducción de un compuesto de interés y/o de la tolerancia a estreses, la utilización de aproximaciones ALE puede ser en determinadas ocasiones una buena alternativa a las aproximaciones racionales de Ingeniería Metabólica. Además, las aproximaciones ALE se pueden combinar con estrategias de Ingeniería Reversa con el objetivo de identificar las mutaciones acumuladas en las cepas evolucionadas y de este modo, “racionalizar” los fenotipos seleccionados y mejorarlos si es posible en nuevas rondas de evolución.

En este punto, se debe explicar cómo este tipo de aproximación puede contribuir a la construcción de una segunda generación de cepas productoras de esteroides. Como se ha mencionado antes, las bajas conversiones de esteroides conseguidas con la mayoría de cepas de *Mycobacterium* puede limitar la viabilidad económica de muchos bioprocesos industriales. La mejora de la productividad puede ser a veces difícilmente alcanzable mediante aproximaciones racionales, ya que es el resultado de la interacción de múltiples parámetros/factores no siempre conocidos: toxicidad asociada a la utilización de concentraciones altas de esteroides, limitaciones en el transporte de sustratos y productos, inhibiciones por acumulación de intermediarios, etc. Por este motivo, la utilización de aproximaciones ALE para la selección de cepas más productoras (p. ej., selección de bacterias con velocidades de crecimiento mayores en esteroides) puede ser interesante. Sin embargo, se debe tener especial cautela en el diseño de estos ensayos, pues frecuentemente presentan una larga duración y pueden llevar a la selección de fenotipos no deseados (p. ej., adaptaciones fenotípicas no estables) (González-Ramos *et al.*, 2016).

3.1.5. Implementación de nuevas alternativas tecnológicas

La baja solubilidad de los sustratos esteroideos en medios acuosos (rango 1-100 μM) (Goetschel y Bar, 1992) limita su biodisponibilidad y por tanto, reduce las eficiencias de conversión de los bioprocesos. Con el objetivo de mejorar esta propiedad, en los últimos años se han explorado distintas estrategias como por ejemplo la micronización o la emulsificación con surfactantes de los sustratos (Egorova *et al.*, 2009; Galán *et al.*, 2017). Por otra parte, dado que la acumulación de sustratos/productos esteroideos en el medio acuoso posiblemente reduce la viabilidad celular y favorece la aparición de mecanismos de inhibición, también se ha investigado el desarrollo de sistemas en dos fases en los que la fase no acuosa actúa como reservorio del sustrato y/o producto. Se han utilizado solventes orgánicos que aumentan notablemente la productividad de los procesos y facilitan los procesos posteriores de purificación, pero cuyo uso está en parte limitado por su toxicidad para los biocatalizadores (De Carvalho *et al.*, 2004). Alternativamente, se ha investigado la utilización de otros medios no acuosos pero biocompatibles conocidos con el nombre de solventes verdes (p. ej., fluidos supercríticos, líquidos iónicos, polímeros líquidos aceites naturales) (Marques *et al.*, 2010).

También se han explorado otro tipo de mejoras tecnológicas en los bioprocesos de producción de esteroides en las últimas décadas. Por ejemplo, se han desarrollado diversos sistemas de producción en continuo o *in situ* que facilitan la recuperación del producto. La adición de la resina amberlita XAD7 al medio de cultivo favoreció la recuperación *in situ* del AD/ADD formado en la conversión a partir de fitoesteroides (Lam, 2010). También se ha explorado la utilización de técnicas de inmovilización (Dias *et al.*, 1994). Esta aproximación permite re-utilizar los biocatalizadores (células) y reduce la toxicidad

asociada al uso de solventes tóxicos en los procesos, pero limita notablemente la transferencia de materia. Una descripción más detallada de estas y otras implementaciones tecnológicas aplicadas a los bioprocesos de producción de esteroides se puede encontrar en la revisión de Donova y Egorova (2012).

3.2. Retos a medio-largo plazo

Los retos a medio-largo plazo de la Biotecnología de Esteroides se alinean en dos objetivos generales interrelacionados ((i) biosíntesis *de novo* de esteroides, (ii) bioproducción a la carta de esteroides), que persiguen el propósito de utilizar distintos microorganismos como biofactorías celulares para la producción industrial de esteroides.

3.2.1. Biosíntesis *de novo* de esteroides

Muchas de las limitaciones asociadas a los bioprocesos que se han mencionado están relacionadas con las propiedades intrínsecas de los sustratos esteroideos (p. ej., baja solubilidad y posible efecto tóxico). Por este motivo, como objetivo a medio-largo plazo de la Biotecnología de Esteroides se propone el desarrollo de biofactorías celulares capaces de sintetizar esteroides de interés a partir de sustratos no-esteroideos de menor coste (p. ej., glucosa). En este sentido, ya se mencionó en la Introducción que se logró la síntesis *de novo* de progesterona e hidrocortisona en *S. cerevisiae* (Duport *et al.*, 1998; Szczebara *et al.*, 2003). Para ello, se modificó la biosíntesis endógena de esteroides de levadura (ergosterol) para la generación de un derivado estructuralmente similar al colesterol, que sirvió de precursor de una ruta heteróloga multi-enzimática que simulaba la síntesis humana de progesterona o hidrocortisona.

Como alternativa a esta estrategia, se propone la biosíntesis *de novo* de esteroides en micobacterias como se ilustra en la Figura 60. Teniendo en cuenta que los esteroides forman parte de la familia de los isoprenoides y que estos compuestos se sintetizan en todos los organismos a través de un patrón de síntesis modular (ver Apartado 1.1.1., Introducción), es posible canalizar mediante ingeniería metabólica la producción de los precursores de la ruta (IPP, DMAPP) hacia la síntesis del escualeno y a partir de éste, por ciclación obtener el lanosterol, compuesto del que derivan todos los esteroides. De esta manera, es posible ensamblar una ruta artificial de biosíntesis de isoprenoides con la ruta de degradación de colesterol parcialmente modificada para la obtención de esteroides de interés industrial. En la literatura, ya se ha descrito que algunas micobacterias pueden modificar el lanosterol a través de la ruta catabólica del colesterol y generar intermediarios de posible interés farmacológico (Wang *et al.*, 2004).

3.2.2. Producción a la carta de esteroides

Las distintas aproximaciones que se han propuesto hasta este momento se fundamentan en la utilización de especies de micobacterias como chasis bacterianos (p. ej., *M. smegmatis*). Sin embargo, es posible que la producción de una batería de compuestos esteroideos de interés no se pueda conseguir con un único chasis microbiano. Por ello, resulta interesante identificar biofactorías celulares alternativas que presenten propiedades óptimas para la producción de esteroides. Por ejemplo, en nuestro grupo se ha propuesto la utilización de la actinobacteria modelo *C. glutamicum* como biofactoría celular para la modificación (p. ej., 3 β -deshidrogenación, 11 α - u 11 β -hidroxilación) de ciertas moléculas esteroideas (Fernández-García, 2015; Felpeto-Santero, 2016).

Por otra parte, también resulta importante identificar nuevos genes/actividades enzimáticas modificadoras de esteroides de interés potencial. Para ello, es necesario llevar a cabo nuevas aproximaciones: explorar nichos ecológicos alternativos (p. ej., fondos marinos, ambientes anóxicos, etc.) mediante aproximaciones metagenómicas; identificar y/o anotar genes en genomas disponibles en las bases de datos mediante aproximaciones bioinformáticas; diseñar proteínas mediante Ingeniería de proteínas; optimizar ensayos *high-throughput* para selección y/o análisis, etc.

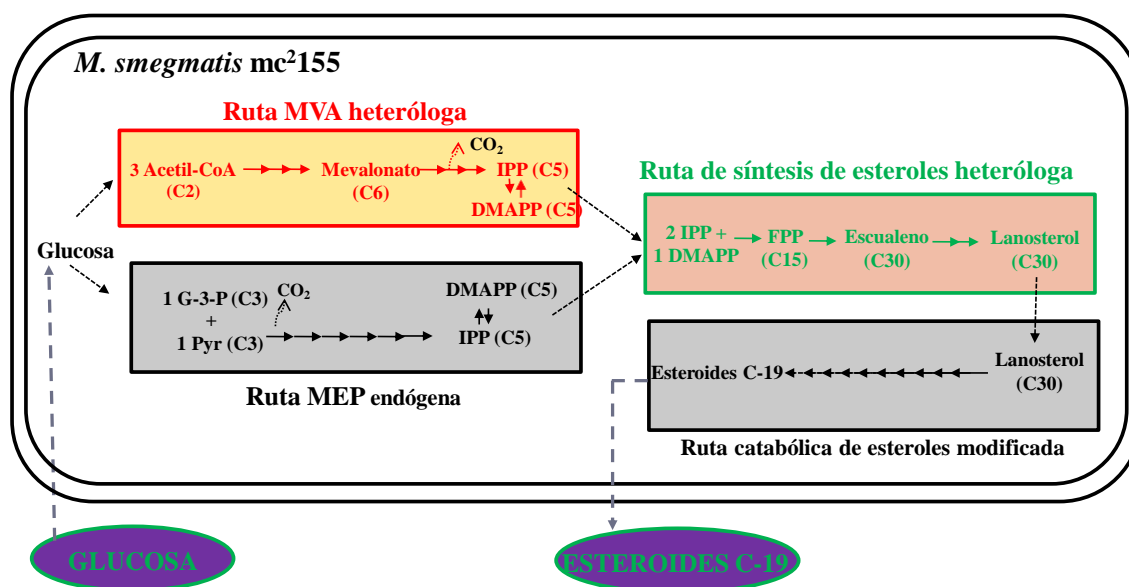


Figura 60. Biosíntesis de novo de esteroides en *M. smegmatis* mc²155. Los esteroides son compuestos orgánicos de la familia universal de los isoprenoides o terpenoides. Estos compuestos se sintetizan biológicamente en todos los organismos siguiendo un patrón modular que consta de cuatro etapas: (i) producción de los monómeros C-5 isopentenil-pirofosfato (IPP) y dimetilalil-pirofosfato (DMAPP), (ii) polimerización de un número variable de monómeros C-5, (iii) ciclación y/o reordenamiento del polímero por la acción de enzimas terpeno sintasas específicas, (iv) decoración enzimática de la molécula para la producción de un compuesto final bioactivo. La producción de los monómeros C-5 puede tener lugar a través de dos rutas metabólicas diferentes: la ruta del mevalonato (MVA) y la ruta del 2C-metil-D-eritritol-4-fosfato (MEP). La primera de las rutas está presente mayoritariamente en eucariotas y arqueas, mientras que la segunda se encuentra en eubacterias y en plástidos de organismos fotosintéticos. Con el objetivo de favorecer la síntesis de precursores, se pretende introducir una ruta MVA en *M. smegmatis*. Después, se pretende canalizar la producción de los precursores de la ruta (IPP, DMAPP) mediante ingeniería metabólica hacia la síntesis del escualeno y a partir de éste, por ciclación obtener el lanosterol, compuesto del que derivan todos los esteroides. Este compuesto será parcialmente degradado a través de la ruta de degradación de esteroides parcialmente modificada para la síntesis de sintonas esteroídicas de interés industrial.

VIII. CONCLUSIONES

El trabajo descrito en esta Tesis Doctoral ha dado lugar a las siguientes conclusiones:

1. Es necesario reformular el catabolismo de esteroides en actinobacterias y en particular, en *Mycobacterium smegmatis*. Los resultados apoyan la hipótesis de que la degradación de la cadena lateral de los esteroides y las modificaciones químicas introducidas en los anillos A/B del núcleo esteroideo ocurren simultáneamente durante el catabolismo de esteroides y por tanto, los compuestos AD, ADD o 9OH-AD no son verdaderos intermediarios de estas rutas.
2. Se ha identificado una nueva ruta catabólica denominada ruta C-19+ involucrada en el catabolismo de esteroides C-19 en *M. smegmatis*, que converge con la ruta catabólica de esteroides a nivel del regulón *kstR2*. El “regulón *padR*” (o “regulón C-19+”), regulado transcripcionalmente por el represor PadR (*MSMEG_2868*), codifica un conjunto de enzimas que catalizan la modificación de los anillos A/B de los esteroides C-19 y se localiza en una región genómica denominada *cluster C-19+*.
3. Se han anotado *clusters* C-19+ homólogos en distintas especies de actinobacterias (p. ej., *R. jostii* RHA1, *G. neofelifaecis* NRRL B-59395, *N. simplex* VKM Ac-2033D), pero excepcionalmente están ausentes en algunas actinobacterias patógenas como por ejemplo *M. tuberculosis*. El *cluster C-19+* tampoco está presente en las cepas industriales *M. neoaurum* VKM Ac-1815D y *Mycobacterium* sp. NRRL B-3805.
4. Se ha demostrado que la bacteria *M. smegmatis* es una biofactoría celular adecuada para la producción de compuestos esteroideos de interés (p. ej., 9OH-AD, testosterona) a partir de esteroides naturales mediante aproximaciones de Ingeniería Metabólica.
5. Se ha demostrado la importancia de seleccionar adecuadamente las enzimas KstD y Ksh para optimizar procesos biotecnológicos industriales que incluyen reacciones de $\Delta^{1,2}$ -deshidrogenación y 9 α -hidroxilación de 3-cetoesteroides, respectivamente.

IX. BIBLIOGRAFÍA

- Abalain, J. H., Di Stefano, S., Amet, Y., Quemener, E., Abalain-Colloc, M. L. y Floch, H. H. (1993).** Cloning, DNA sequencing and expression of (3-17) β hydroxysteroid dehydrogenase from *Pseudomonas testosteroni*. *J Steroid Biochem Mol Biol* **44**: 133-9.
- Ajikumar, P. K., Tyo, K., Carlsen, S., Mucha, O., Phon, T. H. y Stephanopoulos, G. (2008).** Terpenoids: opportunities for biosynthesis of natural product drugs using engineered microorganisms. *Mol Pharm* **5**: 167-90.
- Alvarez, E. y Tavel, E. (1885).** Recherche sur le bacille de Lustgarten. *Archives de Physiologie, Normal et Pathologique*, **6**: 303-21.
- Anderson, K. L. y Purdom, G. (2009).** A creationist perspective of beneficial mutations in bacteria. *Answers in Depth* **4**: 29-42.
- Andor, A., Jekkel, A., Hopwood, D. A., Jeanplong, F., Ilkoy, E., Kónya, A., Kónya, A., Kurucz, I. y Ambrus, G. (2006).** Generation of useful insertionally blocked sterol degradation pathway mutants of fast-growing mycobacteria and cloning, characterization, and expression of the terminal oxygenase of the 3-ketosteroid 9 α -hydroxylase in *Mycobacterium smegmatis* mc(2)155. *Appl Environ Microbiol* **72**: 6554-9.
- Antunes, L. C., Davies, J. E. y Finlay, B. B. (2011).** Chemical signaling in the gastrointestinal tract. *F1000 Biol Rep* **3**: 4.
- Arima, K., Nagasawa, M., Bae, M. y Tamura, G. (1969).** Microbial transformation of sterols. Part I. Decomposition of cholesterol by microorganisms. *Agric Biol Chem* **33**: 1636-43.
- Arnell, R., Johannisson, R., Lindholm, J., Fornstedt, T., Ersson, B., Ballagi, A. y Caldwell, K. (2007).** Biotechnological approach to the synthesis of 9 α -hydroxylated steroids. *Prep Biochem Biotechnol* **37**: 309-21.
- Arya, S. K., Datta, M. y Malhotra B. D. (2008).** Recent advances in cholesterol biosensor. *Biosens Bioelectron* **23**: 1083-100.
- Av-Gay, Y. y Sobouti, R. (2000).** Cholesterol is accumulated by mycobacteria but its degradation is limited to non-pathogenic fast-growing mycobacteria. *Can J Microbiol* **46**: 826-31.
- Balaji, S., Babu, M. M. y Aravind, L. (2007).** Interplay between network structures, regulatory modes and sensing mechanisms of transcription factors in the transcriptional regulatory network of *E. coli*. *J Mol Biol* **372**: 1108-22.
- Barrick, J. E., Yu, D. S., Yoon, S. H., Jeong, H., Oh, T. K., Schneider, D., Lenski, R. E. y Kim J. F. (2009).** Genome evolution and adaptation in a long-term experiment with *Escherichia coli*. *Nature* **461**: 1243-7.
- Barrientos, Á., Merino, E., Casabon, I., Rodríguez, J., Crowe, A. M., Holert, J., Philipp, B., Eltis, E. D., Olivera, E. R. y Luengo, J. M. (2015).** Functional analyses of three acyl-CoA synthetases involved in bile acid degradation in *Pseudomonas putida* DOC21. *Environ Microbiol* **17**: 47-63.
- Barthelmebs, L., Lecomte, B., Divies, C. y Cavin, J. F. (2000).** Inducible metabolism of phenolic acids in *Pediococcus pentosaceus* is encoded by an autoregulated operon which involves a new class of negative transcriptional regulator. *J Bacteriol* **182**: 6724-31.
- Benach, J., Knapp, S., Oppermann, U. C., Häggglund, O., Jörnvall, H. y Ladenstein, R. (1996).** Crystallization and crystal packing of recombinant 3 (or 17) β -hydroxysteroid dehydrogenase from

Comamonas testosteroni ATTC 11996. Eur J Biochem **236**: 144-8.

Benach, J., Filling, C., Oppermann, U. C., Roversi, P., Bricogne, G., Berndt, K. D., Jörnvall, H. y Ladenstein, R. (2002). Structure of bacterial 3 β /17 β -hydroxysteroid dehydrogenase at 1.2 Å resolution: a model for multiple steroid recognition. Biochemistry **41**: 14659-68.

Bergstrand, L. H., Cardenas, E., Holert, J., Van Hamme, J. D. y Mohn, W. W. (2016). Delineation of Steroid-Degrading Microorganisms through Comparative Genomic Analysis. MBio **7**: e00166.

Bhatti, H. N. y Khera, R. A. (2012). Biological transformations of steroidal compounds: a review. Steroids **77**: 1267-90.

Birkenmaier, A., Holert, J., Erdbrink, H., Moeller, H. M., Friemel, A., Schoenenberger, R. Suter, M. M., Klebensberg, J. y Philipp, B. (2007). Biochemical and genetic investigation of initial reactions in aerobic degradation of the bile acid cholate in *Pseudomonas* sp. strain Chol1. J Bacteriol **189**: 7165-73.

Björkhem, I. y Eggertsen, G. (2001). Genes involved in initial steps of bile acid synthesis. Curr Opin Lipidol **12**: 97-103.

Bogovich, K. y Payne, A. H. (1980). Purification of rat testicular microsomal 17-ketosteroid reductase. J Biol Chem **255**: 5552-9.

Borrego, S., Espinosa, E. E., Martí, E. y Fonseca, M. (2000). Conversion of cholesterol to testosterone by *Mycobacterium* sp. MB-3638. Revista CENIC Ciencias Biológicas **31**: 17-20.

Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem **72**: 248-54.

Bradley, R. W., Buck, M. y Wang, B. (2016). Tools and principles for microbial gene circuit engineering. J Mol Biol **428**: 862-88.

Bragin, E. Y., Shtratnikova, V. Y., Dovbnya, D. V., Schelkunov, M. I., Pekov, Y. A., Malakho, S. G., Egorova, O. V., Ivashina, T. V., Sokolov, S. L., Ashapkin, V. V. y Donova, M. V. (2013). Comparative analysis of genes encoding key steroid core oxidation enzymes in fast-growing *Mycobacterium* spp. strains. J Steroid Biochem Mol Biol **138**: 41-53.

Brockhurst, M. A., Colegrave, N. y Rozen, D. E. (2011). Next-generation sequencing as a tool to study microbial evolution. Mol Ecol **20**: 972-80.

Brown, R. L. y Peterson, G. E. (1966). Cholesterol oxidation by soil Actinomycetes. J Gen Microbiol **45**: 441-50.

Brunskole, M., Kristan, K., Stojan, J. y Rižner, T. L. (2009). Mutations that affect coenzyme binding and dimer formation of fungal 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase. Mol Cell Endocrinol **301**: 47-50.

Brzezinska, M., Szulc, I., Brzostek, A., Klink, M., Kielbik, M., Sulowska, Z., Pawelczyk, J. y Dziadek, J. (2013). The role of 3-ketosteroid 1(2)-dehydrogenase in the pathogenicity of *Mycobacterium tuberculosis*. BMC Microbiol **13**: 43.

Brzostek, A., Sliwiński, T., Rumijowska-Galewicz, A., Korycka-Machala, M. y Dziadek, J. (2005). Identification and targeted disruption of the gene encoding the main 3-ketosteroid dehydrogenase in *Mycobacterium smegmatis*. Microbiology **151**: 2393-402.

Brzostek, A., Dziadek, B., Rumijowska-Galewicz, A., Pawelczyk, J. y Dziadek, J. (2007). Cholesterol

oxidase is required for virulence of *Mycobacterium tuberculosis*. FEMS Microbiol Lett **275**: 106-12.

Brzostek, A., Pawelczyk, J., Rumijowska-Galewicz, A., Dziadek, B. y Dziadek, J. (2009). *Mycobacterium tuberculosis* is able to accumulate and utilize cholesterol. J Bacteriol **191**: 6584-91.

Brzostek, A., Rumijowska-Galewicz, A., Dziadek, B., Wojcik, E. A. y Dziadek, J. (2013). ChoD and HsdD can be dispensable for cholesterol degradation in mycobacteria. J Steroid Biochem Mol Biol **134**: 1-7.

Bureik, M. y Bernhardt, R. (2007). Steroid hydroxylation: microbial steroid biotransformations using cytochrome P450 enzymes. In: Schmid, R. D. y Urlacher, V. B. (eds), Modern biooxidation: enzymes, reactions and applications. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim.

Cabrera, J. E., Pruneda Paz, J. L. y Genti-Raimondi, S. (2000). Steroid-inducible transcription of the 3 β /17 β -hydroxysteroid dehydrogenase gene (3 β /17 β -hsd) in *Comamonas testosteroni*. J Steroid Biochem Mol Biol **73**: 147-52.

Capyk, J. K., Kalscheuer, R., Stewart, G. R., Liu, J., Kwon, H., Zhao, R., Okamoto, S., Jacobs, W. R. Jr., Eltis, L. D. y Mohn, W. W. (2009a). Mycobacterial cytochrome P450 125 (Cyp125) catalyzes the terminal hydroxylation of C27-steroids. J Biol Chem **284**: 35534-42.

Capyk, J. K., D'Angelo, I., Strynadka, N. C. y Eltis, L. D. (2009b). Characterization of 3-ketosteroid 9 α -hydroxylase, a rieske oxygenase in the cholesterol degradation pathway of *Mycobacterium tuberculosis*. J Biol Chem **284**: 9937-46.

Capyk, J. K., Casabon, I., Gruninger, R., Strynadka, N. C. y Eltis, L. D. (2011). Activity of 3-ketosteroid 9 α -hydroxylase (KshAB) indicates cholesterol side chain and ring degradation occur simultaneously in *Mycobacterium tuberculosis*. J Biol Chem **286**: 40717-24.

Capyk, J. K. y Eltis, L. D. (2012). Phylogenetic analysis reveals the surprising diversity of an oxygenase class. J Biol Inorg Chem **17**: 425-36.

Carballeira, J. D., Quezada, M. A., Hoyos, P., Simeó, Y., Hernaiz, M. J., Alcantara, A. R. y Sinisterra, J. V. (2009). Microbial cells as catalysts for stereo selective redox reactions. Biotechnol Adv **27**: 686-714.

Casabon, I., Crow, A. M., Liu J. y Eltis, L. D. (2013a). FadD3 is an acyl-CoA synthetase that initiates catabolism of cholesterol rings C and D in actinobacteria. Mol Microbiol **87**: 269-83.

Casabon, I., Zhu, S. H., Otani, H., Liu, J., Mohn, W. W. y Eltis, L. D. (2013b). Regulation of the KstR2 regulon of *Mycobacterium tuberculosis* by a cholesterol catabolite. Mol Microbiol **89**: 1201-12.

Casali, N. y Riley, L. W. (2007). A phylogenomic analysis of the Actinomycetales *mce* operons. BMC Genomics **8**: 60.

Cassetta, A., Büdefeld, T., Rižner, T. L., Kristan, K., Stojan, J. y Lamba, D. (2005). Crystallization, X-ray diffraction analysis and phasing of 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase from the fungus *Cochliobolus lunatus*. Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun **61**: 1032-4.

Chang, M. y Keasling, J. D. (2006). Production of isoprenoid pharmaceuticals by engineered microbes. Nat Chemical Biol **2**: 674-81.

Chang, Y. H., Wang, Y. L., Lin, J. Y., Chuang, L. Y. y Hwang, C. C. (2010). Expression, purification, characterization of a human recombinant 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 in *Escherichia coli*. Mol Biotechnol **44**: 133-39.

- Chang, H., Wan, Y., Wu, S., Fan, Z. y Hu, J. (2011).** Occurrence of androgens and progestogens in wastewater treatment plants and receiving river waters: comparison to estrogens. *Water Res* **45**: 732-40.
- Chen, M. M., Wang, F. Q., Lin, L. C., Yao, K. y Wei, D. Z. (2012).** Characterization and application of fusidane antibiotic biosynthesis enzyme 3-ketosteroid- Δ^1 -dehydrogenase in steroid transformation. *Appl Microbiol Biotechnol* **96**: 133-42.
- Chen, Y. L., Wang, C. H., Yang, F. C., Ismail, W., Wang, P. H., Shih, C. J., Wu, Y. C. y Chiang, Y. R. (2016).** Identification of *Comamonas testosteroni* as an androgen degrader in sewage. *Sci Rep* **6**: 35386.
- Chiang, Y. R., Ismail, W., Müller, M. y Fuchs, G. (2007).** Initial steps in the anoxic metabolism of cholesterol by the denitrifying *Sterolibacterium denitrificans*. *J Biol Chem* **282**: 13240-9.
- Chiang, Y. R., Ismail, W., Heintz, D., Schaeffer, C., Van Dorsselaer, A. y Fuchs, G. (2008a).** Study of anoxic and oxic cholesterol metabolism by *Sterolibacterium denitrificans*. *J Bacteriol* **190**: 905-14.
- Chiang, Y. R., Ismail, W., Gallien, S., Heintz, D., van Dorsselaer, A. y Fuchs, G. (2008b).** Cholest-4-en-3-one- Δ^1 -dehydrogenase, a flavoprotein catalyzing the second step in anoxic cholesterol metabolism. *Appl Environ Microbiol* **74**: 107-13.
- Chiang, Y. R., Fang, J. Y., Ismail, W. y Wang, P. H. (2010).** Initial steps in anoxic testosterone degradation by *Steroidobacter denitrificans*. *Microbiology* **156**: 2253-9.
- Chiple, J. R., Dreyfuss, M. S. y Smucker, R. A. (1975).** Cholesterol metabolism by *Mycobacterium*. *Microbios* **12**: 199-207.
- Choudhary, E., Thakur, P., Pareek, M. y Agarwal, N. (2015).** Gene silencing by CRISPR interference in mycobacteria. *Nat Commun* **6**: 6267.
- Cole, S. T., Brosch, R., Parkhill, J., Garnier, T., Churcher, C., Harris, D., Gordon, S. V., Eiglmeier, K., Gas, S., Barry, C. E. 3rd, Tekaia, F., Badcock, K., Basham, D., Brown, D., Chillingworth, T., Connor, R., Davies, R., Devlin, K., Feltwell, T., Gentles, S., Hamlin, N., Holroyd, S., Hornsby, T., Jagels, K., Krogh, A., McLean, J., Moule, S., Murphy, L., Oliver, K., Osborne, J., Quail, M. A., Rajandream, M. A., Rogers, J., Rutter, S., Seeger, K., Skelton, J., Squares, R., Squares, S., Sulston, J. E., Taylor, K., Whitehead, S. y Barrell, B. G. (1998).** Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. *Nature* **393**: 537-44.
- Coulombe, R., Yue, K. Q., Ghisla, S. y Vrielink, A. (2001).** Oxygen access to the active site of cholesterol oxidase through a narrow channel is gated by an Arg-Glu pair. *J Biol Chem* **276**: 30435-41.
- Crowe, A. M., Stogios, P. J., Casabon, I., Evdokimova, E., Savchenko, A. y Eltis, L. D. (2015).** Structural and functional characterization of a ketosteroid transcriptional regulator of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Biol Chem* **290**: 872-82.
- Cuthbertson, L. y Nodwell, J. R. (2013).** The TetR family of regulators. *Microbiol Mol Biol Rev* **77**: 440-75.
- Cvelbar, D., Zist, V., Kobal, K., Zigon, D. y Zakelj-Mavrič, M. (2013).** Steroid toxicity and detoxification in ascomycetous fungi. *Chem Biol Interact* **202**: 243-58.
- Daughton, C. G. y Ternes, T. A. (1999).** Pharmaceuticals and personal care products in the environment: agents of subtle change? *Environ Health Perspect* **107**: 907-38.
- De Carvalho, C. C., Cruz, A., Angelova, B., Fernandez, P., Pons, M. N., Pinheiro, H. M., Cabral, J. M. y Da Fonseca, M. M. (2004).** Behaviour of *Mycobacterium* sp. NRRL B-3805 whole cells in aqueous,

- organic-aqueous and organic media studied by fluorescence microscopy. *Appl Microbiol Biotechnol* **64**: 695-701.
- Dekel, E. y Alon, U. (2005).** Optimality and evolutionary tuning of the expression level of a protein. *Nature* **436**: 588-92.
- Demain, A. L. (1992).** Microbial secondary metabolism: a new theoretical frontier for academia, a new opportunity for industry. *Ciba Foundation symposium* **171**: 3-16.
- Den Dunnen, J. T. y Antonarakis, S. E. (2000).** Mutation nomenclature extensions and suggestions to describe complex mutations: a discussion. *Hum Mutat* **15**: 7-12.
- Dermer, J. y Fuchs, G. (2012).** Molybdoenzyme that catalyzes the anaerobic hydroxylation of a tertiary carbon atom in the side chain of cholesterol. *J Biol Chem* **287**: 36905-16.
- De Silva, R. S., Kovacikova, G., Lin, W., Taylor, R. K., Skorupski, K. y Kull, F. J. (2005).** Crystal structure of the virulence gene activator AphaA from *Vibrio cholerae* reveals it is a novel member of the winged helix transcription factor superfamily. *J Biol Chem* **280**: 13779-83.
- Dias, A. C., Cabral, J. M. y Pinheiro, H. M. (1994).** Sterol side-chain cleavage with immobilized *Mycobacterium* cells in water-immiscible organic solvents. *Enzyme Microb Technol* **16**: 708-14.
- Đlugoński, J. y Wilmańska, D. (1998).** Deleterious effects of androstenedione on growth and cell morphology of *Schizosaccharomyces pombe*. *Antonie Van Leeuwenhoek*. **73**: 189-94.
- Dlugovitzky, D. G., Fontela, M. S., Martinel Lamas, D. J., Valdez, R. A. y Romano, M. C. (2015).** *Mycobacterium smegmatis* synthesizes in vitro androgens and estrogens from different steroid precursors. *Can J Microbiol* **61**: 451-55.
- Donova, M. V. (2007).** Transformation of steroids by actinobacteria: a review. *Prikl Biokhim Mikrobiol* **43**: 5-18. Artículo en ruso.
- Donova, M. V. (2010).** Steroid bioconversion by actinobacteria. Pushchino, OMTI PSC RAS, 195 p.
- Donova, M. V. y Egorova, O. V. (2012).** Microbial steroid transformations: current state and prospects. *Appl Microbiol Biotechnol* **94**: 1423-47.
- Donova, M. V., Gulevskaya, S. A., Dovbnya, D. V. y Puntus, I. F. (2005a).** *Mycobacterium* sp. mutant strain producing 9 α -hydroxyandrostenedione from sitosterol. *Appl Microbiol Biotechnol* **67**: 671-78.
- Donova, M. V., Dovbnya, D. V., Sukhodolskaya, G. V., Khomutov, S. M., Nikolayeva, V. M., Kwon, I. y Han, K. (2005b).** Microbial conversion of sterol-containing soybean oil production waste. *J Chem Technol Biotechnol* **80**: 55-60.
- Donova, M. V., Egorova, O. V. y Nikolayeva, V. M. (2005c).** Steroid 17 β -reduction by microorganisms- a review. *Process Biochem* **40**: 2253-62.
- Dragosits, M. y Mattanovich, D. (2013).** Adaptive laboratory evolution- principles and applications for biotechnology. *Microb Cell Fact* **12**: 64.
- Dresen, C., Lin, L. Y., D'Angelo, I., Tocheva, E. I., Strynadka, N. y Eltis, L. D. (2010).** A flavin dependent monooxygenase from *Mycobacterium tuberculosis* involved in cholesterol catabolism. *J Biol Chem* **285**: 22264-75.
- Driscoll, M. D., McLean, K. J., Levy, C., Mast, N., Pikuleva, I. A., Lafite, P., Rigby, S. E. J., Leys, D. y Munro, A. W. (2010).** Structural and biochemical characterization of *Mycobacterium tuberculosis* CYP142:

evidence for multiple cholesterol 27-hydroxylase activities in a human pathogen. *J Biol Chem* **285**: 38270-82.

Drozdetskiy, A., Cole, C., Procter, J. y Barton, G. J. (2015). JPred4: a protein secondary structure prediction server. *Nucleic Acids Res* **43**: W389-94.

Drzyzga, O., Fernández de las Heras, L., Morales, V., Navarro Llorens, J. M. y Perera, J. (2011). Cholesterol degradation by *Gordonia cholesterylivorans*. *Appl Environ Microbiol* **77**: 4802-10.

Duport, C., Spagnoli, R., Degryse, E. y Pompon, D. (1998). Self-sufficient biosynthesis of pregnenolone and progesterone in engineered yeast. *Nat Biotechnol* **16**: 186-89.

Edgar, R. C. (2004). MUSCLE: a multiple sequence alignment method with reduced time and space complexity. *BMC Bioinformatics* **5**: 113.

Egorova, O. V., Gulevskaya, S. A., Puntus, I. F., Filonov, A. E. y Donova, M. V. (2002a). Production of androstenedione using mutants of *Mycobacterium* sp. *J Chem Tech Biotech* **77**: 141-47.

Egorova, O. V., Nikolayeva, V. M. y Donova, M. V. (2002b). 17-Hydroxysteroid dehydrogenases of *Mycobacterium* sp. VKM Ac-1815D mutant strain. *J Steroid Biochem Mol Biol* **81**: 273-79.

Egorova, O. V., Nikolayeva, V. M., Suzina, N. E. y Donova, M. V. (2005). Localization of 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase in *Mycobacterium* sp. VKM Ac-1815D mutant strain. *J Steroid Biochem Mol Biol* **94**: 519-25.

Egorova, O. V., Nikolayeva, V. M., Sukhodolskaya, G. V. y Donova, M. V. (2009). Transformation of C₁₉-steroids and testosterone production by sterol-transforming strains of *Mycobacterium* sp. *J Mol Catal B Enzym* **57**: 198-203.

El-Kadi, I. A. y Mostafa, M. E. (2004). Hydroxylation of progesterone by some *Trichoderma* species. *Folia Microbiol (Praha)* **49**: 285-90.

Ercoli, A. y Ruggieri, P.D. (1953). An improved method of preparing testosterone, dihydrotestosterone and some of their esters. *J Am Chem Soc* **75**: 650-53.

Etienne, G., Laval, F., Villeneuve, C., Dinadayala, P., Abouwarda, A., Zerbib, D., Galamba, A. y Daffé, M. (2005). The cell envelope structure and properties of *Mycobacterium smegmatis* mc(2)155: is there a clue for the unique transformability of the strain? *Microbiology* **151**: 2075-86.

Fahrbach, M., Krauss, M., Preiss, A., Kohler, H. P. y Hollender, J. (2010). Anaerobic testosterone degradation in *Steroidobacter denitrificans*- identification of transformation products **158**: 2572-81.

Felpeto-Santero, C. (2016). Producción de esteroides mediante ingeniería de citocromos. Tesis Doctoral. Universidad Complutense de Madrid.

Fernandes, P., Cruz, A., Angelova, B., Pinheiro, H. M. y Cabral, J. M. S. (2003). Microbial conversion of steroid compounds: recent developments. *Enzyme Microb Technol* **32**: 688-705.

Fernández, F. J. y Vega, M. C. (2016). Choose a suitable expression host: a survey of available protein production platforms. *Adv Exp Med Biol* **896**: 15-24.

Fernández de las Heras, L. (2013). Estudio genético y bioquímico de la ruta de degradación de colesterol en *Rhodococcus* spp. Tesis Doctoral. Universidad Complutense de Madrid.

Fernández de Las Heras, L., García Fernández, E., Navarro Llorens, M. J., Perera, J. y Drzyzga, O. (2009). Morphological, physiological, and molecular characterization of a newly isolated steroid-degrading

actinomycete, identified as *Rhodococcus ruber* strain Chol-4. *Curr Microbiol* **59**: 548-53.

Fernández de las Heras, L., Mascaraque, V., García-Fernández, E., Navarro-Llorens, J. M., Perera, J. y Drzyzga, O. (2011). ChoG is the main inducible extracellular cholesterol oxidase of *Rhodococcus* sp. strain CECT3014. *Microbiol Res* **166**: 403-18.

Fernández de las Heras, L., van der Geize, R., Drzyzga, O., Perera, J. y Navarro-Llorens, M. J. (2012). Molecular characterization of three 3-ketosteroid- $\Delta(1)$ -dehydrogenase isoenzymes of *Rhodococcus ruber* strain Chol-4. *J Steroid Biochem Mol Biol* **132**: 271-81.

Fernández-García, L., Blasco, L., Lopez, M., Bou, G., García-Contreras, R., Wood, T. y Tomas, M. (2016). Toxin-antitoxin systems in clinical pathogens. *Toxins (Basel)* **8**. pii:E227

Ferreira, N. P. y Tracey, R. P. (1984). Numerical taxonomy of cholesterol-degrading soil bacteria. *J Appl Microbiol* **57**: 429-46.

Fibriansah, G., Kovács, Á. T., Pool, T. J., Boonstra, M., Kuipers, O. P. y Thunnissen, A. M. (2012). Crystal structures of two transcriptional regulators from *Bacillus cereus* define the conserved structural features of a PadR subfamily. *PLoS One* **7**: e48015.

Fogal, S., Bergantino, E., Motterle, R., Castellin, A. y Arvotti A. (2013). Process for the preparation of testosterone. Patent US 2013/8592178B2.

Foster, P.L. (2005). Stress responses and genetic variation in bacteria. *Mutat Res* **569**: 3-11.

Frank, D. J., Waddling, C. A., La, M. y Ortiz de Montellano, P. R. (2015). Cytochrome P450 125A4, the third cholesterol C-26 hydroxylase from *Mycobacterium smegmatis*. *Biochemistry* **54**: 6909-16.

Freier, T. A., Beitz, D. C., Li, L. M. y Hartman, P. A. (1994). Characterization of *Eubacterium coprostanoligenes* sp. nov., a cholesterol-reducing anaerobe. *Int J Syst Bacteriol* **44**: 137-42.

Fujii, K., Kikuchi, S., Satomi, M., Ushio-Sata, N. y Morita, N. (2002). Degradation of 17 β -estradiol by a gram-negative bacterium isolated from activated sludge in a sewage treatment plant in Tokyo, Japan. *Appl Environ Microbiol* **68**: 2057-60.

Fujii, K., Satomi, M., Morita, N., Motomura, T., Tanaka, T. y Kikuchi, S. (2003). *Novosphingobium tardagens* sp. nov., an oestradiol-degrading bacterium isolated from activated sludge of a sewage treatment plant in Tokyo. *Int J Syst Evol Microbiol* **53**: 47-52.

Gagné, F., Blaise, C. y André, C. (2006). Occurrence of pharmaceutical products in a municipal effluent and toxicity to rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) hepatocytes. *Ecotoxicol Environ Saf* **64**: 329-36.

Galán, B., Uhía, I., García-Fernández, E., Martínez, I., Bahillo, E., de la Fuente, J. L., Barredo, J. L., Fernández-Cabezón, L. y García, J. L. (2017). *Mycobacterium smegmatis* is a suitable cell factory for the production of steroidal synthons. *Microb Biotechnol* **10**: 138-50.

García, J. L., Uhía, I. y Galán, B. (2012). Catabolism and biotechnological applications of cholesterol degrading bacteria. *Microb Biotechnol* **5**: 679-99.

García-Fernández, J. (2015). Estudio del transporte de esteroides en *Mycobacterium smegmatis* mc²155 y sus aplicaciones biotecnológicas. Tesis Doctoral. Universidad Complutense de Madrid.

García-Fernández, E., Frank, D. J., Galán, B., Kells, P. M., Podust, L. M., García, J. L. y Ortiz de Montellano, P. R. (2013). A highly conserved mycobacterial cholesterol catabolic pathway. *Environ Microbiol* **15**: 2342-59.

- García-Fernández, E., Medrano, F. J., Galán, B. y García, J. L. (2014).** Deciphering the transcriptional regulation of cholesterol catabolic pathway in mycobacteria: identification of the inducer of KstR repressor. *J Biol Chem* **289**: 17576-88.
- García-Fernández, J., Galán, B., Medrano, F. J. y García, J. L. (2015).** Characterization of the KstR2 regulator responsible of the lower cholesterol degradative pathway in *Mycobacterium smegmatis*. *Environ Microbiol Rep* **7**: 155-63.
- Genti-Raimondi, S., Tolmasky, M. E., Patrino, L. C., Flury, A. y Actis, L. A. (1991).** Molecular cloning and expression of the beta-hydroxysteroid dehydrogenase gene from *Pseudomonas testosteroni*. *Gene* **105**: 43-9.
- Gibson, D. T. K. C., Wang, C. J., Sih, C. J. y Whitlock, H. Jr. (1966).** Mechanisms of steroid oxidation by microorganisms. IX. On the mechanism of ring A cleavage in the degradation of 9,10-seco steroids by microorganisms. *J Biol Chem* **241**: 551-9.
- Goetschel, R. y Bar, R. (1992).** Formation of mixed crystals in microbial conversion of sterols and steroids. *Enzyme Microb Technol* **14**: 462-9.
- González-Ramos, D., Gorter de Vries, A. R., Grijseels, S. S., van Berkum, M. C., Swinnen, S., van den Broek, M., Nevoigt, E., Daran, J. M., Pronk, J. T. y van Maris, A. J. (2016).** A new laboratory evolution approach to select for constitutive acetic acid tolerance in *Saccharomyces cerevisiae* and identification of causal mutations. *Biotechnol Biofuels* **9**: 173.
- Goodfellow, M. y Alderson, G. (1977).** The actinomycete-genus *Rhodococcus*: a home for the 'rhodochrous' complex. *J Gen Microbiol* **100**: 99-122.
- Goren, T., Harnik, M., Rimon, S. y Aharonowitz, Y. (1983).** 1-Ene-steroid reductase of *Mycobacterium* sp. NRRL B-3805. *J Steroid Biochem* **19**: 1789-97.
- Griffin, J. E., Pandey, A. K., Gilmore, S. A., Mizrahi, V., McKinney, J. D., Bertozzi, C. R. y Sassetti, C. M. (2012).** Cholesterol catabolism by *Mycobacterium tuberculosis* requires transcriptional and metabolic adaptations. *Chem Biol* **19**: 218-27.
- Gury, J., Barthelmebs, L., Tran, N. P., Diviès, C. y Cavin, J. F. (2004).** Cloning, deletion, and characterization of PadR, the transcriptional repressor of the phenolic acid decarboxylase-encoding *padA* gene of *Lactobacillus plantarum*. *Appl Environ Microbiol* **70**: 2146-53.
- Hakki, T., Zearo, S., Drăgan, C.A., Bureik, M. y Bernhardt, R. (2008).** Coexpression of redox partners increases the hydrocortisone (cortisol) production efficiency in *CYP11B1* expressing fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *J Biotechnol* **133**: 351-59.
- Hamada, H. y Kawabe, S. (1991).** Biotransformation of 4-androstene- 3,17-dione by green cell suspension of *Marchantia polymorpha*: stereoselective reduction at carbon 17. *Life Sci* **48**: 613-15.
- Hannemann, F., Virus, C. y Bernhardt, R. (2006).** Design of an *Escherichia coli* system for whole cell mediated steroid synthesis and molecular evolution of steroid hydroxylases. *J Biotechnol* **124**: 172-81.
- Hanselman, T. A., Graetz, D. A. y Wilkie, A. C. (2003).** Manure-borne estrogens as potential environmental contaminants: a review. *Environ Sci Technol* **37**: 5471-78.
- Hanson, J. R. (2005).** Steroids: reactions and partial synthesis. *Nat Prod Rep* **22**: 104-10.
- Harder, J. y Probian, C. (1997).** Anaerobic mineralization of cholesterol by a novel type of denitrifying

bacterium. Arch Microbiol **15**: 269-74.

Haußmann, U., Wolters, D. A., Fränzel, B., Eltis, L. D. y Poetsch, A. (2013). Physiological adaptation of the *Rhodococcus jostii* RHA1 membrane proteome to steroids as growth substrates. J Proteome Res **12**: 1188-98.

Herring, C. D., Raghunathan, A., Honisch, C., Patel, T., Applebee, M. K., Joyce, A. R., Albert, T. J., Blattner, F. R., van den Boom, D., Cantor, C. R. y Palsson B. (2006). Comparative genome sequencing of *Escherichia coli* allows observation of bacterial evolution on a laboratory timescale. Nat Genet **38**: 1406-12.

Heux, S., Meynial-Salles, I. O'Donohue, M. J. y Dumon, C. (2015). White biotechnology: state of the art strategies for the development of biocatalysts for biorefining. Biotechnol Adv **33**: 1653-70.

Ho, N. A., Dawes, S. S., Crowe, A. M., Casabon, I., Gao, C., Kendall, S. L., Baker, E. N., Eltis, L. D. y Lott, J. S. (2016). The structure of the transcriptional repressor KstR in complex with CoA thioester cholesterol metabolites sheds light on the regulation of cholesterol catabolism in *Mycobacterium tuberculosis*. J Biol Chem **291**: 7256-66.

Holert, J., Alam, I., Larsen, M., Antunes, A., Bajic, V. B., Stingl, U. y Philipp, B. (2013a). Genome sequence of *Pseudomonas* sp. strain Chol1, a model organism for the degradation of bile salts and other steroid compounds. Genome Announc **1**. pii: e00014-12.

Holert, J., Jagmann, N. y Philipp, B. (2013b). The essential function of genes for a hydratase and an aldehyde dehydrogenase for growth of *Pseudomonas* sp. strain Chol1 with the steroid compound cholate indicates an aldolytic reaction step for deacetylation of the side chain. J Bacteriol **195**: 3371-80.

Holert, J., Kulić, Ž., Yücel, O., Suvekbala, V., Suter, M. J., Möller, H. M. y Philipp, B. (2013c). Degradation of the acyl side chain of the steroid compound cholate in *Pseudomonas* sp. strain Chol1 proceeds via an aldehyde intermediate. J Bacteriol **195**: 585-95

Holert, J., Yücel, O., Jagmann, N., Prestel, A., Möller, H. M. y Philipp, B. (2016). Identification of bypass reactions leading to the formation of one central steroid degradation intermediate in metabolism of different bile salts in *Pseudomonas* sp. strain Chol1. Environ Microbiol **18**: 3373-89.

Horinouchi, S., Ishizuka, H. y Beppu, T. (1991). Cloning, nucleotide sequence, and transcriptional analysis of the NAD(P)-dependent cholesterol dehydrogenase gene from a *Nocardia* sp. and its hyperexpression in *Streptomyces* spp. Appl Environ Microbiol **57**: 1386-93.

Horinouchi, M., Yamamoto, T., Taguchi, K., Arai, H. y Kudo, T. (2001). Metacleavage enzyme gene *tesB* is necessary for testosterone degradation in *Comamonas testosteroni* TA441. Microbiology **147**: 3367-75.

Horinouchi, M., Hayashi, T., Koshino, H., Yamamoto, T. y Kudo, T. (2003a). Gene encoding the hydrolase for the product of the meta-cleavage reaction in testosterone degradation by *Comamonas testosteroni*. Appl Environ Microbiol **69**: 2139-52.

Horinouchi, M., Hayashi, T., Yamamoto, T. y Kudo, T. (2003b). A new bacterial steroid degradation gene cluster in *Comamonas testosteroni* TA441 which consists of aromatic-compound degradation genes for seco-steroids and 3-ketosteroid dehydrogenase genes. Appl Environ Microbiol **69**: 4421-30.

Horinouchi, M., Hayashi, T. y Kudo, T. (2004a). The genes encoding the hydroxylase of 3-hydroxy-9,10-secoandrosta-1,3,5(10)-triene-9,17-dione in steroid degradation in *Comamonas testosteroni* TA441. J

Steroid Biochem Mol Biol **92**: 143-54.

Horinouchi, M., Kurita, T., Yamamoto, T., Hatori, E., Hayashi, T. y Kudo, T. (2004b). Steroid degradation gene cluster of *Comamonas testosteroni* consisting of 18 putative genes from meta-cleavage enzyme gene *tesB* to regulator gene *tesR*. Biochem Biophys Res Commun **324**: 597-604.

Horinouchi, M., Hayashi, T., Koshino, H., Kurita, T. y Kudo, T. (2005). Identification of 9,17-dioxo-1,2,3,4,10,19-hexanorandrost-5-oic acid, 4-hydroxy-2-oxohexanoic acid, and 2-hydroxyhexa-2,4-dienoic acid and related enzymes involved in testosterone degradation in *Comamonas testosteroni* TA441. Appl Environ Microbiol **71**: 5275-81.

Horinouchi, M., Hayashi, T., Koshino, H. y Kudo, T. (2006). ORF18-disrupted mutant of *Comamonas testosteroni* TA441 accumulates significant amounts of 9,17-dioxo-1,2,3,4,10,19-hexanorandrost-5-oic acid and its derivatives after incubation with steroids. J Steroid Biochem Mol Biol **101**: 78-84.

Horinouchi, M., Hayashi, T., Koshino, H., Malon, M., Yamamoto, T. y Kudo, T. (2008). Identification of genes involved in inversion of stereochemistry of a C-12 hydroxyl group in the catabolism of cholic acid by *Comamonas testosteroni* TA441. J Bacteriol **190**: 5545-54.

Horinouchi, M., Kurita, T., Hayashi, T. y Kudo, T. (2010). Steroid degradation genes in *Comamonas testosteroni* TA441: Isolation of genes encoding a $\Delta 4(5)$ -isomerase and 3α - and 3β -dehydrogenases and evidence for a 100 kb steroid degradation gene hot spot. J Steroid Biochem Mol Biol **122**: 253-63.

Horinouchi, M., Hayashi, T. y Kudo, T. (2012). Steroid degradation in *Comamonas testosteroni*. J Steroid Biochem Mol Biol **129**: 4-14.

Horinouchi, M., Hayashi, T., Koshino, H., Malon, M., Hirota, H. y Kudo, T. (2014a). Identification of 9α -hydroxy-17-oxo-1,2,3,4,10,19-hexanorandrost-6-en-5-oic acid and β -oxidation products of the C-17 side chain in cholic acid degradation by *Comamonas testosteroni* TA441. J Steroid Biochem Mol Biol **143**: 306-22.

Horinouchi, M., Hayashi, T., Koshino, H., Malon, M., Hirota, H. y Kudo, T. (2014b). Identification of 9α -hydroxy-17-oxo-1,2,3,4,10,19-hexanorandrost-5-oic acid in steroid degradation by *Comamonas testosteroni* TA441 and its conversion to the corresponding 6-en-5-oyl coenzyme A (CoA) involving open reading frame 28 (ORF28)- and ORF30-encoded acyl-CoA dehydrogenases. J Bacteriol **196**: 3598-608.

Hu, Y., van der Geize, R., Besra, G. S., Guracha, S. S., Liu, A., Rohde, M., Singh, M. y Coates, A. (2010). 3-Ketosteroid 9α -hydroxylase is an essential factor in the pathogenesis of *Mycobacterium tuberculosis*. Mol Microbiol **75**: 107-21.

Hughes, D. T. y Sperandio, V. (2008). Inter-kingdom signalling: communication between bacteria and their hosts. Nat Rev Microbiol **6**: 111-20.

Huillet, E., Velge, P., Vallaey, T. y Pardon, P. (2006). LadR, a new PadR-related transcriptional regulator from *Listeria monocytogenes*, negatively regulates the expression of the multidrug efflux pump MdrL. FEMS Microbiol Lett **254**: 87-94.

Hung, B., Falero, A., Llanes, N., Pérez, C. y Ramírez, M. A. (1994). Testosterone as biotransformation product in steroid conversion by *Mycobacterium* sp. Biotechnol Lett **16**: 497-500.

Imada, Y. y Takahashi, K. (1980). Process for producing steroidal alcohols. Patente US 4,223,091.

- Isabelle, M., Villemur, R., Juteau, P. y Lépine, F. (2011).** Isolation of estrogen-degrading bacteria from an activated sludge bioreactor treating swine waste, including a strain that converts estrone to β -estradiol. *Can J Microbiol* **57**: 559-68.
- Ismail, W. y Chiang, Y. R. (2011).** Oxic and anoxic metabolism of steroids by bacteria. *J Bioremed Biodegrad* **S1**: 001.
- Jackson, M., Reinaldo Camacho, L., Gicquel, B. y Guilhot, C. (2001).** Gene replacement and transposon delivery using the negative selection marker *sacB*. *Methods Mol Med* **54**: 59-75.
- Jakočiūnas, T., Jensen, M. K. y Keasling, J. D. (2016).** CRISPR/Cas9 advances engineering of microbial cell factories. *Metab Eng* **34**: 44-59.
- Jayaraman, R. (2011).** Hypermutation and stress adaptation in bacteria. *J Genet* **90**: 383-91.
- JCBN. (1989).** Nomenclature of steroids. *Pure Appl Chem*, **61**: 1783-822.
- Johnston, J. B., Ouellet, H. y de Montellano, P. R. O. (2010).** Functional redundancy of steroid C26-monooxygenase activity in *Mycobacterium tuberculosis* revealed by biochemical and genetic analyses. *J Biol Chem* **285**: 36352-60.
- Joshi, S. M., Pandey, A. K., Capite, N., Fortune, S. M., Rubin, E. J. y Sassetti C. M. (2006).** Characterization of mycobacterial virulence genes through genetic interaction mapping. *Proc Natl Acad Sci* **103**: 11760-5.
- Jubete, E., Loaiza, O. A., Ochoteco, E., Pomposo, J. A., Grande, H. y Rodríguez, J. (2009).** Nanotechnology: A tool for improved performance on electrochemical screen-printed (Bio)Sensors. *Sensors*, Volume 2009.
- Kanno, A. I., Goulart, C., Rofatto, H. K., Oliveira, S. C., Leite, L. C. y McFadden, J. (2016).** New recombinant *Mycobacterium bovis* BCG expression vectors: improving genetic control over mycobacterial promoters. *Appl Environ Microbiol* **82**: 2240–6.
- Kendall, S. L., Withers, M., Soffair, C. N., Moreland, N. J., Gurcha, S., Sidders, B., Frita, R., Ten Bokum, A., Besra, G. S., Lott, J. S. y Stoker, N. G. (2007).** A highly conserved transcriptional repressor controls a large regulon involved in lipid degradation in *Mycobacterium smegmatis* and *Mycobacterium tuberculosis*. *Mol Microbiol* **65**: 684–99.
- Kendall, S. L., Burgess, P., Balhana, R., Withers, M., Ten Bokum, A., Lott, J. S., Gao, C., Uhía-Castro, I. y Stoker, N. G. (2010).** Cholesterol utilization in mycobacteria is controlled by two TetR-type transcriptional regulators: *kstR* and *kstR2*. *Microbiology* **156**: 1362–71.
- Kieslich, K. (1985).** Microbial side-chain degradation of sterols. *J Basic Microbiol* **25**: 461-74.
- Kiss, F. M., Lundemo, M. T., Zapp, J., Woodley, J. M. y Bernhardt, R. (2015).** Process development for the production of 15 β -hydroxycyproterone acetate using *Bacillus megaterium* expressing *CYP106A2* as whole-cell biocatalyst. *Microb Cell Fact* **14**: 28.
- Klein, U., Gimpl, G. y Fahrenholz, F. (1995).** Alteration of the myometrial plasma membrane cholesterol content with β -cyclodextrin modulates the binding affinity of the oxytocin receptor. *Biochemistry* **34**: 13784–93.
- Klepp, L. I., Forrellad, M. A., Osella, A. V., Blanco, F. C., Stella, E. J., Bianco, M. V., Santangelo, Mde. L., Sassetti, C., Jackson, M., Cataldi, A. A., Bigi, F. y Morbidoni, H. R. (2012).** Impact of the

deletion of the six *mce* operons in *Mycobacterium smegmatis*. *Microbes Infect* **14**: 590-99.

Klink, M., Brzezinska, M., Szulc, I., Brzostek, A., Kielbik, M., Sulowska, Z. y Dziadek, J. (2013). Cholesterol oxidase is indispensable in the pathogenesis of *Mycobacterium tuberculosis*. *PLoS One* **8**: e73333.

Kolar, N. W., Swart, A. C., Mason, J. I. y Swart, P. (2007). Functional expression and characterisation of human cytochrome P45017alpha in *Pichia pastoris*. *J Biotechnol* **129**: 635-44.

Kolek, T., Szpineter, A. y Swizdor, A. (2008). Baeyer-Villiger oxidation of DHEA, pregnenolone, and androstenedione by *Penicillium lilacinum* AM111. *Steroids* **73**: 1441-5.

Knol, J., Bodewits, K., Hessels, G. I., Dijkhuizen, L. y van der Geize, R. (2008). 3-Keto-5alpha-steroid delta(1)-dehydrogenase from *Rhodococcus erythropolis* SQ1 and its orthologue in *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv are highly specific enzymes that function in cholesterol catabolism. *Biochem J* **410**: 339-46.

Kreit, J. y Sampson, N. S. (2009). Cholesterol oxidase: physiological functions. *FEBS J* **276**: 6844-56.

Kristan, K. y Rižner, T. L. (2012). Steroid-transforming enzymes in fungi. *J Steroid Biochem Mol Biol* **129**: 79-91.

Kristan, K., Rižner, T. L., Stojan, J., Gerber, J. K., Kremmer, E. y Adamski, J. (2003). Significance of individual amino acid residues for coenzyme and substrate specificity of 17β-hydroxysteroid dehydrogenase from the fungus *Cochliobolus lunatus*. *Chem Biol Interact* **143-144**: 493-501.

Kristan, K., Stojan, J., Möller, G., Adamski, J. y Rižner, T. L. (2005). Coenzyme specificity in fungal 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase. *Mol Cell Endocrinol* **241**: 80-7.

Kristan, K., Adamski, J., Rižner, T. L. y Stojan, J. (2007a). His164 regulates accessibility to the active site in fungal 17β-hydroxysteroid dehydrogenase. *Biochimie* **89**: 63-71.

Kristan, K., Stojan, J., Adamski, J. y Lanisnik Rižner, T. (2007b). Rational design of novel mutants of fungal 17β-hydroxysteroid dehydrogenase. *J Biotechnol*. **129**: 123-30.

Krysteva, M. A. y Grigorova, P. M. (1987). Transformation of cortisol to prednisolone by viable cells of *Arthrobacter simplex* covalently immobilized on cellulose granules. *Enzyme Microb Technol* **9**: 538-541.

Kumar, S., Stecher, G. y Tamura, K. (2016). MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for bigger datasets. *Mol Biol Evol* **33**: 1870-4.

Kurusu, F., Zang, K., Kasuga, I., Furumai, H. y Yagi, O. (2015). Identification of estrone-degrading Betaproteobacteria in activated sludge by microautoradiography fluorescent in situ hybridization. *Lett Appl Microbiol* **61**: 28-35.

Kutsuna, S., Kondo, T., Ikegami, H., Uzumaki, T., Katayama, M. y Ishiura, M. (2007). The circadian clock-related gene *pex* regulates a negative cis element in the *kaiA* promoter region. *J Bacteriol* **189**: 7690-6.

Lack, N., Lowe, E. D., Liu, J., Eltis, L. D., Noble, M. E., Sim, E. y Westwood, I. M. (2008). Structure of HsaD, a steroid-degrading hydrolase, from *Mycobacterium tuberculosis*. *Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun* **64**: 2-7.

Lack, N. A., Yam, K. C., Lowe, E. D., Horsman, G. P., Owen, R. L., Sim, E. y Eltis, L. D. (2010). Characterization of a carbon-carbon hydrolase from *Mycobacterium tuberculosis* involved in cholesterol

metabolism. J Biol Chem **285**: 434-43.

Ladrón, N., Fernández, M., Agüero, J., Zörn, B. G., Vázquez-Boland, J. A. y Navas, J. (2003). Rapid identification of *Rhodococcus equi* by a PCR assay targeting the *choE* gene. J Clin Microbiol **41**: 3241-45.

Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature **227**: 680-5.

Lam, K. S. (2010). Application of whole-cell biotransformation in the pharmaceutical industry. In: Tao, J., Lin, G. Q. y Liese, A. (Ed) Biocatalysis for the pharmaceutical industry: discovery, development, and manufacturing. Wiley, New York, pp 213–227.

Lamb, D. C., Jackson, C. J., Warrilow, A. G., Manning, N. J., Kelly, D. E. y Kelly, S. L. (2007). Lanosterol biosynthesis in the prokaryote *Methylococcus capsulatus*: insight into the evolution of sterol biosynthesis. Mol Biol Evol **24**: 1714-21.

Lario, P. I., Sampson, N. y Vrielink, A. (2003). Sub-atomic resolution crystal structure of cholesterol oxidase: what atomic resolution crystallography reveals about enzyme mechanism and the role of the FAD cofactor in redox activity. J Mol Biol **326**: 1635-50.

Laveaga, G. S. (2005). Uncommon trajectories: steroid hormones, Mexican peasants, and the search for a wild yam. Stud Hist Phil Biol Biomed Sci **36**: 743–60.

Lednicer, D. (2011). Steroid chemistry at a glance. Wiley, Chichester.

Lee, S. S. y Sih, C. J. (1967). Mechanisms of steroid oxidation by microorganisms. XII. Metabolism of hexahydroindanpropionic acid derivatives. Biochemistry **6**: 1395-403.

Lee, C. Y. y Liu, W. H. (1992). Production of androsta-1,4-diene-3,17-dione from cholesterol using immobilized growing cells of *Mycobacterium* sp. NRRL B-3683 adsorbed on solid carriers. Appl Microbiol Biotechnol **36**: 598-603.

Lee, L. S., Strock, T. J., Sarmah, A. K. y Rao, P. S. C. (2003). Sorption and Dissipation of Testosterone, Estrogens, and Their Primary Transformation Products in Soils and Sediment. Environ Sci Technol **37**: 4098-105.

Lee, J. Y., Na, Y. A., Kim, E., Lee, H. S. y Kim P. (2016). The Actinobacterium *Corynebacterium glutamicum*, an industrial workhorse. J Microbiol Biotechnol **26**: 807-22.

Lefebvre, Y. A., Schultz, R., Groman, E. V. y Watanabe, M. (1979). Localization of 3 β and 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase in *Pseudomonas testosteroni*. J Steroid Biochem **10**: 523-8.

Lehmann, K. B. y Neumann, R. O. (1899). Atlas und Grundriss der Bakteriologie und Lehrbuch der speziellen bakteriologischen Diagnostik. J. F. Lehmann Verlag, München, II, p. 193.

Lehmann, K.B. y Neumann, R.O. (1930). Bacteriology, especially determinative bacteriology. New York, G.E. Stechert and co. 1.

Leipold, F., Rudroff, F., Miholovilovic, M. D. y Bornscheuer, U. T. (2013). The steroid monooxygenase from *Rhodococcus rhodochrous* – a versatile biocatalyst. Tetrahedon: Asymmetry **24**: 1620-24.

Leisch, H., Morley, K. y Lau, P. C. (2011). Baeyer-Villiger monooxygenases: more than just green chemistry. Chem Rev **111**: 4165-222.

Leu, Y. L., Wang, P. H., Shiao, M. S., Ismail, W. y Chiang, Y. R. (2011). A novel testosterone catabolic

pathway in bacteria. *J Bacteriol* **193**: 4447-55.

Li, J., Vrielink, A., Brick, P. y Blow, D. M. (1993). Crystal structure of cholesterol oxidase complexed with a steroid substrate: Implications for flavin adenine dinucleotide dependent alcohol oxidases. *Biochemistry* **32**: 11507-15.

Li, L., Buhman, K. K., Hartman, P. A. y Beitz, D. C. (1995). Hypocholesterolemic effect of *Eubacterium coprostanoligenes* ATCC 51222 in rabbits. *Lett Appl Microbiol* **20**: 137-40.

Li, H., Liu, H. M., Ge, W., Huang, L. y Shan, L. (2005). Synthesis of 7 α -hydroxy-dehydroepiandrosterone and 7 β -hydroxy-dehydroepiandrosterone. *Steroids* **70**: 970-3.

Li, Y., Lu, F., Sun, T. y Du, L. (2007). Expression of *ksdD* gene encoding 3-ketosteroid-Delta1-dehydrogenase from *Arthrobacter simplex* in *Bacillus subtilis*. *Lett Appl Microbiol* **44**: 563-8.

Li, W., Ge, F., Zhang, Q., Ren, Y., Yuan, J., He, J., Li, W., Chen, G., Zhang, G., Zhuang, Y. y Xu, L. (2014). Identification of gene expression profiles in the actinomycete *Gordonia neofelifaecis* grown with different steroids. *Genome* **57**: 345-53.

Li, Q., Ge, F., Tan, Y., Zhang, G. y Li, W. (2016). Genome-wide transcriptome profiling of *Mycobacterium smegmatis* mc²155 cultivated in minimal media supplemented with cholesterol, androstenedione or glycerol. *Int J Mol Sci* **17**: 689.

Lin, C. W., Wang, P. H., Ismail, W., Tsai, Y. W., El Nayal, A., Yang, C. Y., Yang, F. C., Wang, C. H. y Chiang, Y. R. (2015). Substrate uptake and subcellular compartmentation of anoxic cholesterol catabolism in *Sterolibacterium denitrificans*. *J Biol Chem* **290**: 1155-69.

Liu, W. H. y Lo, C. K. (1997). Production of testosterone from cholesterol using a single-step microbial transformation of *Mycobacterium* sp. *J Ind Microbiol Biotechnol* **19**: 269-72.

Liu, W. H., Kuo, C. W., Wu, K. L., Lee, C. Y. y Hsu, W. Y. (1994). Transformation of cholesterol to testosterone by *Mycobacterium* sp. *J Ind Microbiol* **13**: 167-71.

Liu, Y., Shen, Y., Qiao, Y., Su, L., Li, C. y Wang, M. (2016). The effect of 3-ketosteroid- Δ (1)-dehydrogenase isoenzymes on the transformation of AD to 9 α -OH-AD by *Rhodococcus rhodochrous* DSM 43269. *J Ind Microbiol Biotechnol* **43**: 1303-11.

Llanes, N., Hung, B., Falero, A., Pérez, C. y Aguila, B. (1995). Glucose and lactose effect on AD and ADD bioconversion by *Mycobacterium* sp. *Biotechnol Lett* **17**: 1237-40.

Lo, C. K., Pan, C. P. y Liu, W. H. (2002). Production of testosterone from phytosterol using a single-step microbial transformation by a mutant of *Mycobacterium* sp. *J Ind Microbiol Biotechnol* **28**: 280-3.

Lubelski, J., de Jong, A., van Merkerk, R., Agustindari, H., Kuipers, O. P., Kok, J. y Driessen, A. J. (2006). LmrCD is a major multidrug resistance transporter in *Lactococcus lactis*. *Mol Microbiol* **61**: 771-81.

Ma, C., Qin, D., Sun, Q., Zhang, F., Liu, H. y Yu, C. P. (2016). Removal of environmental estrogens by bacterial cell immobilization technique. *Chemosphere* **144**: 607-14.

Malaviya, A. y Gomes, J. (2008). Androstenedione production by biotransformation of phytosterols. *Bioresour Technol* **99**: 6725-37.

Manosroi, J., Saowakhon, S. y Manosroi, A. (2008). Enhancement of 17 α -hydroxyprogesterone production from progesterone by biotransformation using hydroxypropyl-beta-cyclodextrin complexation technique. *J Steroid Biochem Mol Biol* **112**: 201-4.

- Marchais-Oberwinkler, S., Henn, C., Möller, G., Klein, T., Negri, M., Oster, A., Spadaro, A., Werth, R., Wetzel, M., Xu, K., Frotscher, M., Hartmann, R. W. and Adamski, J. (2011).** 17 β -Hydroxysteroid dehydrogenases (17 β -HSDs) as therapeutic targets: protein structures, functions, and recent progress in inhibitor development. *J Steroid Biochem Mol Biol* **125**: 66-82.
- Marsheck, W. J., Kraychy, S. y Muir, R. D. (1972).** Microbial degradation of sterols. *Appl Microbiol* **23**: 72-7.
- Martin, C. K. A. (1977).** Microbial cleavage of sterol side chains. *Adv Appl Microbiol* **22**: 29-58.
- Martinez, J. L y Baquero, F. (2000).** Mutation frequencies and antibiotic resistance. *Antimicrob Agents Chemother* **44**: 1771-77.
- Martínková, L., Uhnáková, B., Pátek, M., Nešvera, J. y Křen V. (2009).** Biodegradation potential of the genus *Rhodococcus*. *Environment International* **35**: 162-77.
- Marques, M. P. C., Carvalho, F., de Carvalho, C. C. C. R., Cabral, J. M. S. y Fernandes, P. (2010).** Steroid bioconversion: towards green processes. *Food Bioprod Proces* **88**: 12–20.
- Mathieu, J. M., Mohn, W. W., Eltis, L. D., LeBlanc, J. C., Stewart, G. R., Dresen, C., Okamoto, K. y Alvarez, P. J. (2010).** 7-ketocholesterol catabolism by *Rhodococcus jostii* RHA1. *Appl Environ Microbiol* **76**: 352-55.
- McLean, K. J., Lafite, P., Levy, C., Cheesman, M. R., Mast, N., Pikuleva, I. A., Leys, D. y Munro, A. W. (2009).** The structure of *Mycobacterium tuberculosis* CYP125: Molecular basis for cholesterol binding in a P450 needed for host infection. *J Biol Chem* **284**: 35524-33.
- Mei, G., Lei, F., Liang-Fei, L., Dai-Jie, C. y Xing, X. (2005).** *Mycobacterium fortuitum* and its use in production of testosterone by conversion of microbe. Patent CN1670185 A.
- Merino, E., Barrientos, A., Rodríguez, J., Naharro, G., Luengo, J. M. y Olivera, E. R. (2013).** Isolation of cholesterol- and deoxycholate-degrading bacteria from soil samples: evidence of a common pathway. *Appl Microbiol Biotechnol* **97**: 891-904.
- Miclo, A. y Germain, P. (1990).** Catabolism of methylperhydroindanedione propionate by *Rhodococcus equi*: evidence of a MEPHIP-reductase activity. *Appl Microbiol Biotechnol* **32**: 594-99.
- Miclo, A. y Germain, P. (1992).** Hexahydroindanone derivatives of steroids formed by *Rhodococcus equi*. *Appl Microbiol Biotechnol* **36**: 456-60.
- Miller, W. L. (1988).** Molecular biology of steroid hormone synthesis. *Endocr Rev* **9**: 295-318.
- Miller, M. B. y Bassler, B. L. (2001).** Quorum sensing in bacteria. *Annu Rev Microbiol* **55**: 165-99.
- Minard, P., Legoy, M. D. y Thomas, D. (1985).** 3 β ,17 β -Hydroxysteroid dehydrogenase of *Pseudomonas testosteroni*. Kinetic evidence for the bifunctional activity at a common catalytic site. *FEBS Lett* **188**: 85-90.
- Miner, M. D., Chang, J. C., Pandey, A. K., Sassetti, C. M. y Sherman, D. R. (2009).** Role of cholesterol in *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Indian J Exp Biol* **47**: 407-11.
- Moeller, G. y Adamski, J. (2006).** Multifunctionality of human 17 β -hydroxysteroid dehydrogenases. *J Steroid Biochem Mol Biol* **125**: 66-82.
- Moeller, G. y Adamski, J. (2009).** Integrated view on 17 β -hydroxysteroid dehydrogenases. *Mol Cell Endocrinol* **25**: 7-19.

- Mohn, W. W., van der Geize, R., Stewart, G. R., Okamoto, S., Liu, J., Dijkhuizen, L. y Eltis, L. D. (2008). The actinobacterial *mce4* locus encodes a steroid transporter. *J Biol Chem* **283**: 35368–74.
- Mohn, W. W., Wilbrink, M. H., Casabon, I., Stewart, G. R., Liu, J., van der Geize, R. y Eltis, L. D. (2012). Gene cluster encoding cholate catabolism in *Rhodococcus* spp. *J Bacteriol* **194**: 6712-19.
- Molina-Henares, A. J., Krell, T., Eugenia Guazzaroni, M., Segura, A. y Ramos, J. L. (2006). Members of the IclR family of bacterial transcriptional regulators function as activators and/or repressors. *FEMS Microbiol Rev* **30**: 157-86.
- Morii, S., Sawamoto, S., Yamauchi, Y., Miyamoto, M., Iwami, M. y Itagaki, E. (1999). Steroid monooxygenase of *Rhodococcus rhodochrous*: sequencing of the genomic DNA, and hyperexpression, purification, and characterization of the recombinant enzyme. *J Biochem* **126**: 624-31.
- Murphy, K. C., Papavinasasundaram, K. y Sassetti, C. M. (2015). Mycobacterial recombineering. *Methods Mol Biol* **1285**: 177–99.
- Nagasawa, M., Bae, M., Tamura, G. y Arima, K. (1969). Microbial transformation of steroids. Part II. Cleavage of sterols side chains by microorganisms. *Agric Biol Chem* **33**: 1644–50.
- Navas, J., González-Zorn, B., Ladrón, N., Garrido, P. y Vázquez-Boland, J.A. (2001). Identification and mutagenesis by allelic exchange of *choE*, encoding a cholesterol oxidase from the intracellular pathogen *Rhodococcus equi*. *J Bacteriol* **183**: 4796-805.
- Nelson, D. L. y Cox, M. M. (2012). Lehninger principles of biochemistry. 6th edition. New York, WH Freeman.
- Nesbitt, N. M., Yang, X., Fontán, P., Kolesnikova, I., Smith, I., Sampson, N. S. y Dubnau, E. (2010). A thiolase of *Mycobacterium tuberculosis* is required for virulence and production of androstenedione and androstadienedione from cholesterol. *Infect Immun* **78**: 275-82.
- Nguyen, D. Q., Righini, C., Darouassi, Y. y Schmerber, S. (2011). Nasal infection due to *Mycobacterium fortuitum*. *Eur Ann Otorhinolaryngol Head Neck Dis* **128**: 197-9.
- Nielsen, J. y Keasling, J. D. (2016). Engineering cellular metabolism. *Cell* **164**: 1185-97.
- Nielsen, J., Fussenegger, M., Keasling, J., Lee, S. Y., Liao, J. C., Prather, K. y Palsson, B. (2014). Engineering synergy in biotechnology. *Nat Chem Biol* **10**: 319-22.
- Ooi, L. G. y Liong, M. T. (2010). Cholesterol-lowering effects of probiotics and prebiotics: a review of in vivo and in vitro findings. *Int J Mol Sci* **11**: 2499–522.
- Oppermann, U. C. y Maser, E. (1996). Characterization of a 3 alpha-hydroxysteroid dehydrogenase/carbonyl reductase from the gram-negative bacterium *Comamonas testosteroni*. *Eur J Biochem* **241**: 744-9.
- Oppermann, U. C., Filling, C., Berndt, K. D., Persson, B., Benach, J., Ladenstein, R. y Jörnvall, H. (1997). Active site directed mutagenesis of 3β/17β-hydroxysteroid dehydrogenase establishes differential effects on short-chain dehydrogenase/reductase reactions. *Biochemistry* **36**: 34-40.
- Ouellet, H., Guan, S., Johnston, J. B., Chow, E. D., Kells, P. M., Burlingame, A. L., Cox, J. S., Podust, L. M. y de Montellano, P. R. (2010). *Mycobacterium tuberculosis* CYP125A1, a steroid C27 monooxygenase that detoxifies intracellularly generated cholest-4-en-3-one. *Mol Microbiol* **77**: 730–42.
- Ouellet, H., Johnston, J. B. y de Montellano, P. R. (2011). Cholesterol catabolism as a therapeutic

target in *Mycobacterium tuberculosis*. Trends Microbiol **19**: 530-9.

Owen, R. W., Mason, A. N. y Bilton, R. F. (1983). The degradation of cholesterol by *Pseudomonas* sp. NCIB 10590 under aerobic conditions. J Lipid Res **24**: 1500-11.

Pajic, T., Vitas, M., Zigon, D., Pavko, A., Kelly, S. L. y Komel, R. (1999). Biotransformation of steroids by the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. Yeast **15**: 639-45.

Pandey, A. K. y Sassetti, C. M. (2008). Mycobacterial persistence requires the utilization of host cholesterol. Proc Natl Acad Sci USA **105**: 4376-80.

Parish, T. y Stoker, N. G. (1998). Electroporation of mycobacteria. Methods Mol Biol **101**: 129-44.

Payne, D. W. y Talalay, P. (1985). Isolation of novel microbial 3 alpha-, 3 beta-, and 17 beta-hydroxysteroid dehydrogenases. Purification, characterization, and analytical applications of a 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase from an *Alcaligenes* sp. J Biol Chem **260**: 13648-55.

Pearson, A., Budin, M. y Brocks, J. J. (2003). Phylogenetic and biochemical evidence for sterol synthesis in the bacterium *Gemmata obscuriglobus*. Proc Natl Acad Sci USA **100**: 15352-7.

Peart, P. C., McCook, K. P., Russell, F. A., Reynolds, W. F. y Reese, P. B. (2011). Hydroxylation of steroids by *Fusarium oxysporum*, *Exophiala jeanselmei* and *Ceratocystis paradoxa*. Steroids **76**: 1317-30

Peltoketo, H., Luu-The¹, V., Simard, J. y Adamski, J. (1999). 17β-Hydroxysteroid dehydrogenase (HSD)/17-ketosteroid reductase (KSR) family; nomenclature and main characteristics of the 17HSD/KSR enzymes. J Mol Endocrinol **23**: 1-11.

Penfield, J. S., Worrall, L. J., Strynadka, N. C. y Eltis, L. D. (2014). Substrate specificities and conformational flexibility of 3-ketosteroid 9α-hydroxylases. J Biol Chem **289**: 25523-36.

Pereira, D. I. A. y Gibson, G. R. (2002). Cholesterol assimilation by lactic acid bacteria and bifidobacteria isolated from the human gut. Appl Environ Microbiol **68**: 4689-93.

Petrič, S., Hakki, T., Bernhardt, R., Zigon, D. y Crešnar, B. (2010). Discovery of a steroid 11α-hydroxylase from *Rhizopus oryzae* and its biotechnological application. J Biotechnol **150**: 428-37.

Petrusma, M., Dijkhuizen L. y van der Geize, R. (2009). *Rhodococcus rhodochrous* DSM 43269 3-ketosteroid 9α-hydroxylase, a two-component iron-sulfur-containing monooxygenase with subtle steroid substrate specificity. Appl Environ Microbiol **75**: 5300-7.

Petrusma, M., Hessels, G., Dijkhuizen, L. y van der Geize, R. (2011). Multiplicity of 3-ketosteroid-9α-hydroxylase enzymes in *Rhodococcus rhodochrous* DSM 43269 for specific degradation of different classes of steroids. J Bacteriol **193**: 3931-40.

Petrusma, M., Dijkhuizen, L. y van der Geize, R. (2012). Structural features in the KshA terminal oxygenase protein that determine substrate preference of 3-ketosteroid 9α-hydroxylase enzymes. J Bacteriol **194**: 115-21.

Petrusma, M., van der Geize, R. y Dijkhuizen, L. (2014). 3-Ketosteroid 9α-hydroxylase enzymes: rieske non-heme monooxygenases essential for bacterial steroid degradation. Antonie Van Leeuwenhoek **106**: 157-72.

Philipp, B., Erdbrink, H., Suter, M. J. y Schink, B. (2006). Degradation of and sensitivity to cholate in *Pseudomonas* sp. strain Chol1. Arch Microbiol **185**: 192-201.

Pines, G., Freed, E. F., Winkler, J. D. y Gill, R. T. (2015). Bacterial recombineering: genome engineering

via phage-based homologous recombination. *ACS Synth Biol* **4**: 1176-85.

Plemenitas, A., Zakelj-Mayric, M. y Komel, R. (1988). Hydroxysteroid dehydrogenase of *Cochliobolus lunatus*. *J Steroid Biochem* **29**: 371-2.

Puigbò, P., Guzmán, E., Romeu, A. y Garcia-Vallvé, S. (2007). OPTIMIZER: A web server for optimizing the codon usage of DNA sequences. *Nucl Acids Res* **35**: W126-W131.

Raman, D. R., Williams, E. L., Layton, A. C., Burns, R. T., Easter, J. P., Daugherty, A. S., Mullen, M. D. y Sayler, G. S. (2004). Estrogen Content of Dairy and Swine Wastes. *Environ Sci Technol* **38**: 3567-73.

Reese, P. (2007). Biotransformation of terpenes and steroids by fungi. In: Zhu, Y. Z., Tan, B. K. H., Bay, B.H., Liu, C. H. (eds); *Natural products: essential resources for human survival*. Word Scientific Publishing Co Pte Ltd, Singapore, pp 71-76.

Rižner, T. L. y Zakelj-Mavric, M. (2000). Characterization of fungal 17 β -hydroxysteroid dehydrogenases. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* **127**: 53-63.

Rižner, T. L., Zakelj-Mavric, M., Plemenitas, A. y Zorko, M. (1996). Purification and characterization of 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase from the filamentous fungus *Cochliobolus lunatus*. *J Steroid Biochem Mol Biol* **59**: 205-14.

Rižner, T. L., Moeller, G., Thole, H. H., Zakelj-Mavric, M. y Adamski, J. (1999). A novel 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase in the fungus *Cochliobolus lunatus*: new insights into the evolution of steroid-hormone signalling. *Biochem* **337**: 425-31.

Rižner, T. L., Adamski, J. y Stojan, J. (2000). 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase from *Cochliobolus lunatus*: model structure and substrate specificity. *Arch Biochem Biophys* **15**: 255-62.

Rižner, T. L., Stojan, J. y Adamski, J. (2001a). 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase from the fungus *Cochliobolus lunatus*: structural and functional aspects. *Chem Biol Interact* **130-132**: 793-803.

Rižner, T. L., Stojan, J. y Adamski, J. (2001b). Searching for the physiological function of 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase from the fungus *Cochliobolus lunatus*: studies of substrate specificity and expression analysis. *Mol Cell Endocrinol* **171**: 193-8.

Rodríguez-García, A., Fernández-Alegre, E., Morales, A., Sola-Landa, A., Lorraine, J., Macdonald, S., Dovbnva, D., Smith, M. C., Donova, M. y Barreiro, C. (2016). Complete genome sequence of 'Mycobacterium neoaurum' NRRL B-3805, an androstenedione (AD) producer for industrial biotransformation of sterols. *J Biotechnol* **224**: 64-5.

Roglič, U., Plazl, I. y Žnidaršič-Plazl, P. (2007). Batch and continuous transformation of progesterone by *Rhizopus nigricans* pellets in the presence of β -cyclodextrin. *Biocat Biotrans* **25**: 16-23.

Roh, H. y Chu, K. H. (2010). A 17 β -estradiol-utilizing bacterium, *Sphingomonas* strain KC8: part I-characterization and abundance in wastewater treatment plants. *Environ Sci Technol* **44**: 4943-50.

Rohman, A., van Oosterwijk, N., Thunnissen, A. M. y Dijkstra, B. W. (2013). Crystal structure and site-directed mutagenesis of 3-ketosteroid Δ 1-dehydrogenase from *Rhodococcus erythropolis* SQ1 explain its catalytic mechanism. *J Biol Chem* **288**: 35559-68.

Rösch, V., Denger, K., Schleheck, D., Smits, T. H. y Cook, A. M. (2008). Different bacterial strategies to degrade taurocholate. *Arch Microbiol* **190**: 11-8.

Rosłonec, K. Z., Wilbrink, M. H., Capyk, J. K., Mohn, W. W., Ostendorf, M., van der Geize, R.,

- Dijkhuizen, L. y Eltis, L. D. (2009). Cytochrome P450 125 (CYP125) catalyzes C26-hydroxylation to initiate sterol side chain degradation in *Rhodococcus jostii* RHA1. *Mol Microbiol* **74**: 1031–43.
- Routledge, E. J., Sheahan, D., Desbrow, C., Brighty, G. C., Waldock M. y Sumpter, J. (1998). Identification of Estrogenic Chemicals in STW Effluent. 2. In Vivo responses in Trout and Roach. *Environ Sci Technol* **32**: 1559-65.
- Ruijsenaars, H. J., Sperling, E. M., Wiegerinck, P. H., Brands, F. T., Wery, J. y de Bont, J. A. (2007). Testosterone 15beta-hydroxylation by solvent tolerant *Pseudomonas putida* S12. *J Biotechnol* **131**: 205-8.
- Rustad, T. R., Sherid, A. M., Minch, K. J. y Sherman, D. R. (2009). Hypoxia: a window into *Mycobacterium tuberculosis* latency. *Cell Microbiol* **11**: 1151-9.
- Sambrook, J. y Russell, D.W. (2001). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3rd edn. New York, NY, USA: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sarmah, U., Roy, M. K. y Singh, H. D. (1989). Steroid transformation by a strain of *Arthrobacter oxydans* incapable of steroid ring degradation. *J Basic Microbiol* **29**: 85–92.
- Sassetti, C. M. y Rubin, E. J. (2003). Genetic requirements for mycobacterial survival during infection. *Proc Natl Acad Sci USA* **100**: 12989–94.
- Schaefer, C. M., Lu, R., Nesbitt, N. M., Schiebel, J., Sampson, N. S. y Kisker, C. (2015). FadA5 a thiolase from *Mycobacterium tuberculosis*: a steroid-binding pocket reveals the potential for drug development against tuberculosis. *Structure* **23**: 21-33.
- Schloendorn, J., Webb, T., Kemmish, K., Hamalainen, M., Jackemeyer, D., Jiang, L., Mathieu, J., Rebo, J., Sankman, J., Sherman, L., Tontson, L., Qureshi, A., Alvarez, P. y Rittmann, B. (2009). Medical bioremediation: a concept moving toward reality. *Rejuvenation Res* **12**: 411-9.
- Schultz, R. M., Groman, E. V., y Engel, L. L. (1977). 3(17) β -Hydroxysteroid dehydrogenase of *Pseudomonas testosteroni*. A convenient purification and demonstration of multiple molecular forms. *J Biol Chem* **252**: 3775-83.
- Sedlacek, L. y Leland, L. S. (1988). Biotransformations of Steroids. *Crit Rev Biotechnol* **7**: 187-236.
- Shao, M., Sha, Z., Zhang, X., Rao, Z., Xu, M., Yang, T., Xu, Z. y Yang, S. (2017). Efficient androst-1,4-diene-3,17-dione production by co-expressing 3-ketosteroid- Δ 1-dehydrogenase and catalase in *Bacillus subtilis*. *J Appl Microbiol* **122**: 119-28.
- Shou, C., Bhardwaj, N., Lam, H. Y., Yan, K. K., Kim, P. M., Snyder, M. y Gerstein, M. B. (2011). Measuring the evolutionary rewiring of biological networks. *PLoS Comput Biol* **7**: e1001050.
- Shtratnikova, V. Y., Bragin, E. Y., Dovbnya, D. V., Pekov, Y. A., Schelkunov, M. I., Strizhov, N., Ivashina, T. V., Ashapkin, V. V. y Donova, M. V. (2014). Complete genome sequence of sterol-transforming *Mycobacterium neoaurum* strain VKM Ac-1815D. *Genome Announc* **2**: e01177-13.
- Shtratnikova, V. Y., Schelkunov, M. I., Dovbnya, D. V., Pekov, Y. A., Bragin, E. Y., Ashaphin, V. V. y Donova, M. V. (2015a). Complete genome sequence of *Mycobacterium sp.* strain VKM Ac-1817D, capable of producing 9 α -hydroxy-androst-4-ene-3,17-dione from phytosterol. *Genome Announc* **3**: e01447-14.
- Shtratnikova, V. Y., Schelkunov, M. I., Pekov, Y. A., Logacheva, M. D., Sokolov, S. L. Bragin, E. Y., Ashapkin, V. V. y Donova, M. V. (2015b). Complete genome sequence of steroid-transforming

Nocardioides simplex VKM Ac-2033D. Genome Announc **3**: e01406-14.

Shtratnikova, V. Y., Schelkunov, M. I., Fokina, V. V., Pekov, Y. A., Ivashina, T. y Donova, M.V. (2016). Genome-wide bioinformatics analysis of steroid metabolism-associated genes in *Nocardioides simplex* VKM Ac-2033D. Curr Genet **62**: 643-56.

Sih, C. J. y Whitlock, H. W. (1968). Biochemistry of Steroids. Annu Rev Biochem **37**: 661-94.

Sih, C. J., Wang, K. C., Gibson, D. T. y Whitlock, H. W. (1965). On the mechanism of ring A cleavage in the degradation of 9,10-seco steroids by microorganisms. J Am Chem Soc **87**: 1386-7.

Silber, J., Kramer, A., Labes, A. y Tasdemir, D. (2016). From Discovery to production: biotechnology of marine fungi for the production of new antibiotics. Mar Drugs **14**, pii: E137.

Singer, Y., Shity, H. y Bar, R. (1991). Microbial transformations in a cyclodextrin medium. Part 2. Reduction of androstenedione to testosterone by *Saccharomyces cerevisiae*. Appl Microbiol Biotechnol **35**: 731-7.

Smith, M., Zahnley, J., Pfeifer, D. y Goff, D. (1993). Growth and cholesterol oxidation by *Mycobacterium* species in Tween 80 medium. Appl Environ Microbiol **59**: 1425-9.

Snapper, S. B., Melton, R. E., Mustafa, S., Klesser, T. y Jacobs, W. R. Jr. (1990). Isolation and characterization of efficient plasmid transformation mutants of *Mycobacterium smegmatis*. Mol Microbiol **4**: 1911-19.

Sobel, H. y Plaut, A. (1949). The assimilation of cholesterol by *Mycobacterium smegmatis*. J Bacteriol **57**: 377-82.

Söhngen, N. L. (1913). Benzin, Petroleum, Paraffinöl und Paraffin als Kohlenstoff- und Energiequelle für Mikroben. Zentr Bacteriol Parasitenk Abt II **37**: 595-609.

Somalinga, V. y Mohn, W. W. (2013). *Rhodococcus jostii* Porin A (RjpA) functions in cholate uptake. Appl Environ Microbiol **79**: 6191-93.

Song, H., Sandie, R., Wang, Y., Andrade-Navarro, M. A. y Niederweis, M. (2008). Identification of outer membrane proteins of *Mycobacterium tuberculosis*. Tuberculosis **88**: 526-44.

Stover, C. K., de la Cruz, V. F., Fuerst, T. R., Burlein, J. E., Benson, L. A., Bennett, L. T., Bansal, G. P., Young, J. F., Lee, M. H., Hatfull, G. F., Snapper, S. B., Barletta, R. G., Jacobs, J. R. y Bloom, B. R. (1991). New use of BCG for recombinant vaccines. Nature **351**: 456-60.

Summers, Z. M., Ueki, T., Ismail, W., Haverman, S. A. y Lovley, D. R. (2012). Laboratory evolution of *Geobacter sulfurreducens* for enhanced growth on lactate via a single-base-pair substitution in a transcriptional regulator. ISME J **6**: 975-83.

Svegelj, M. B., Stojan, J. y Rižner, T. L. (2012). The role of Ala231 and Trp227 in the substrate specificities of fungal 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase and trihydroxynaphthalene reductase: Steroids versus smaller substrates. J Steroid Biochem Mol Biol **129**: 92-8.

Swain, K., Casabon, I., Eltis, L. D. y Mohn, W. W. (2012). Two transporters essential for reassimilation of novel cholate metabolites by *Rhodococcus jostii* RHA1. J Bacteriol **194**: 6720-7.

Swank, R. T. y Munkres, K. D. (1971). Molecular weight analysis of oligopeptides by electrophoresis in polyacrylamide gel with sodium dodecyl sulfate. Anal Biochem **39**: 462-77.

Szczębara, F. M., Chandelier, C., Villeret, C., Masurel, A., Bourot, S., Duport, C., Blanchard, S.,

- Groisillier, A. Testet, E., Costaglioli, P., Cauet, G., Degryse, E., Balbuena, D., Winter, J., Achstetter, T., Spagnoli, R. Pompon, D. y Dumas, B. (2003). Total biosynthesis of hydrocortisone from a simple carbon source in yeast. *Nat Biotechnol* **21**: 143-9.
- Szentirmai, A. (1990). Microbial physiology of sidechain degradation of sterols. *J Ind Microbiol* **6**: 101-15.
- Tak, J. D. (1942). On bacteria decomposing cholesterol. *Antonie van Leeuwenhoek* **8**: 32-40.
- Tamaoka, J., Ha, D. M. y Komagata, K. (1987). Reclassification of *Pseudomonas acidovorans* den Dooren de Jong 1926 and *Pseudomonas testosteroni* Marcus and Talahay 1956 as *Comamonas acidovorans* comb. nov. and *Comamonas testosteroni* comb. nov. with an emended description of the genus *Comamonas*. *Int J Syst Bacteriol* **37**: 52-9.
- Tarlera S. y Denner E. B. (2003). *Sterolibacterium denitrificans* gen. nov., sp. nov., a novel cholesterol oxidizing, denitrifying member of the beta-Proteobacteria. *Int J Syst Evol Microbiol* **53**: 1085-91.
- Thomas, S. T. y Sampson, N. S. (2013). *Mycobacterium tuberculosis* utilizes a unique heterotetrameric structure for dehydrogenation of the cholesterol side chain. *Biochemistry* **52**: 2895-904.
- Thomas, S. T., VanderVen, B. C., Sherman, D. R., Russell, D. G. y Sampson, N. S. (2011). Pathway profiling in *Mycobacterium tuberculosis*: elucidation of cholesterol-derived catabolite and enzymes that catalyze its metabolism. *J Biol Chem* **286**: 43668-78.
- Thompson, J. D., Higgins, D. G. y Gibson, T. J. (1994). CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucl Acids Res* **22**: 4673-80.
- Titgemeyer, F., Amon, J., Parche, S., Mahfoud, M., Bail, J., Schlicht, M., Rehm, N., Hillmann, D., Stephan, J. Walter, B., Burkovski, A. y Niederweis, M. (2007). A genomic view of sugar transport in *Mycobacterium smegmatis* and *Mycobacterium tuberculosis*. *J Bacteriol* **189**: 5903-15.
- Tong, W. Y. y Dong, X. (2009). Microbial biotransformation: recent developments on steroid drugs. *Recent Pat Biotechnol* **3**: 141-53.
- Tran, N. P, Gury, J., Dartois, V., Nguyen, T. K., Seraut, H., Barthelmebs, L., Gervais, P. y Cavin, J. F. (2008). Phenolic acid-mediated regulation of the *padC* gene, encoding the phenolic acid decarboxylase of *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* **190**: 3213-24.
- Trevisan, V. (1889). I generi e le specie delle batteriacee, Zanaboni and Gabuzzi. Milan.
- Tsukamura, M. (1972). A new species of rapidly growing, scotochromogenic mycobacteria *Mycobacterium neoaurum* Tsukamura n. sp. (Japanese). *Med Biol* **85**: 229-33.
- Tsukamura, M. (1976). Properties of *Mycobacterium smegmatis* freshly isolated from soil. *Jpn J Microbiol* **20**: 355-6.
- Uhía, I. (2010). Análisis genético y bioquímico del catabolismo del colesterol en *Mycobacterium smegmatis* mc²155. Tesis Doctoral. Universidad Complutense de Madrid.
- Uhía, I., Galán, B., Morales, V. y García, J. L. (2011a). Initial step in the catabolism of cholesterol by *Mycobacterium smegmatis* mc²155. *Environ Microbiol* **13**: 943-59.
- Uhía, I., Galán, B., Medrano, F. J. y García, J. L. (2011b). Characterization of the KstR-dependent promoter of the gene for the first step of the cholesterol degradative pathway in *Mycobacterium smegmatis*. *Microbiology* **157**: 2670-80.

- Uhía, I., Galán, B., Kendall, S. L., Stoker, N. G. y García, J. L. (2012). Cholesterol metabolism in *Mycobacterium smegmatis*. *Environ Microbiol Rep* **4**: 168-82.
- Ulrich, N. P. y Lanisnik Rižner, T. (2006). Conformational stability of 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase from the fungus *Cochliobolus lunatus*. *FEBS J* **273**: 3927-37.
- Van der Geize, R. y Dijkhuizen, L. (2004). Harnessing the catabolic diversity of rhodococci for environmental and biotechnological applications. *Curr Opin Microbiol* **7**: 255-61.
- Van der Geize, R., Hessels, G. I., van Gerwen, R., Vrijbloed, J. W., van Der Meijden, P. y Dijkhuizen, L. (2000). Targeted disruption of the *kstD* gene encoding a 3-kestosteroid delta(1)-dehydrogenase isoenzyme of *Rhodococcus erythropolis* strain SQ1. *Appl Environ Microbiol* **66**: 2029-36.
- Van der Geize, R., Hessels, G. I., van Gerwen, R., van der Meijden, P. y Dijkhuizen, L. (2001). Unmarked gene deletion mutagenesis of *kstD*, encoding 3-kestosteroid delta1-dehydrogenase, in *Rhodococcus erythropolis* SQ1 using *sacB* as counter-selectable marker. *FEMS Microbiol Lett* **205**: 197-202.
- Van der Geize, R., Hessels, G. I. y Dijkhuizen L. (2002a). Molecular and functional characterization of the *kstD2* gene of *Rhodococcus erythropolis* SQ1 encoding a second 3-kestosteroid Δ 1-dehydrogenase isoenzyme. *Microbiology* **148**: 3285-92.
- Van der Geize, R., Hessels, G. I., Gerwen, R. V., Meijden, P. V. D. y Dijkhuizen L. (2002b). Molecular and functional characterization of *kshA* and *kshB*, encoding two components of 3-kestosteroid 9 α -hydroxylase, a class IA monooxygenase, in *Rhodococcus erythropolis* strain SQ1. *Mol Microbiol* **45**: 1007-18.
- Van der Geize, R., Yam, K., Heuser, T., Wilbrink, M. H., Hara, H., Anderton, M. C., Sim, E., Dijkhuizen, L., Davies, J. E., Mohn, W. W. y Eltis, L. D. (2007). A gene cluster encoding cholesterol catabolism in a soil actinomycete provides insight into *Mycobacterium tuberculosis* survival in macrophages. *Proc Natl Acad Sci USA* **104**: 1947-52.
- Van der Geize, R., Hessels, G. I., Nienhuis-Kuiper, M. y Dijkhuizen, L. (2008). Characterization of a second *Rhodococcus erythropolis* SQ1 3-kestosteroid 9 α -hydroxylase activity comprising a terminal oxygenase homologue, KshA2, active with oxygenase-reductase component KshB. *Appl Environ Microbiol* **74**: 7197-203.
- Van der Geize, R., Grommen, A. W., Hessels, G. I., Jacobs, A. A. y Dijkhuizen, L. (2011). The steroid catabolic pathway of the intracellular pathogen *Rhodococcus equi* is important for pathogenesis and a target for vaccine development. *PLoS Pathog* **7**: e1002181.
- Van der Ven, B. C., Fahey, R. J., Lee, W., Liu, Y., Abramovitch, R. B., Memmott, C., Crowe, A. M., Eltis, L. D., Perola, E., Deininger, D. D., Wang, T., Locher, C. P. y Russell, D. G. (2015). Novel inhibitors of cholesterol degradation in *Mycobacterium tuberculosis* reveal how the bacterium's metabolism is constrained by the intracellular environment. *PLoS Pathog* **11**: e1004679.
- Veiga, P., Juste, C., Lepercq, P., Saunier, K., Béguet, F. y Gérard, P. (2005). Correlation between faecal microbial community structure and cholesterol-to-coprostanol conversion in the human gut. *FEMS Microbiol Lett* **242**: 81-6.
- Vico, P., Cauet, G., Rose, K., Lathe, R. y Degryse, E. (2002). Dehydroepiandrosterone (DHEA) metabolism in *Saccharomyces cerevisiae* expressing mammalian steroid hydroxylase CYP7B: Ayr1p and Fox2p display 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase activity. *Yeast* **19**: 873-86.

- Villemur, R., Dos Santos, S. C., Ouellette, J., Juteau, P., Lépine, F. y Déziel, E. (2013). Biodegradation of endocrine disruptors in solid-liquid two-phase partitioning systems by enrichment cultures. *Appl Environ Microbiol* **79**: 4701-11.
- Wang, K. C., Gau, C. S. y Chen, R. L. (1982). Microbial oxidation of sterol. I. Conversion of cholesterol and sitosterol to 17-hydroxy steroids. *J Taiwan Pharm Assoc* **34**: 129-37.
- Wang, K. C., You, B. J., Jan, J. L. y Lee, S. S. (2004). Microbial transformation of lanosterol derivatives with *Mycobacterium* sp. (NRRL B-3805). *J Nat Prod* **58**: 1222.
- Wang, F. Q., Li, B., Wang, W., Zhang, C. G. y Wei, D. Z. (2007). Biotransformation of diosgenin to nuatigenin-type steroid by a newly isolated strain, *Streptomyces virginiae* IBL-14. *Appl Microbiol Biotechnol* **77**: 771-7.
- Wang, F. Q., Zhang, C. G., Li, B., Wei, D. Z. y Tong, W. Y. (2009a). New microbiological transformations of steroids by *Streptomyces virginiae* IBL-14. *Environ Sci Technol* **43**: 5967-74.
- Wang, W., Wang, F. Q. y Wei, D. Z. (2009b). Characterization of P450 FcpC, the enzyme responsible for bioconversion of diosgenone to isonuatigenone in *Streptomyces virginiae* IBL-14. *Appl Environ Microbiol* **75**: 4202-5.
- Wang, F. Q., Yao, K. y Wei, D. Z. (2011). From soybean phytosterols to steroid hormones. In: El-Shemy, H. (ed), *Soybean and health*. InTech—Open Access Publisher, Rijeka, pp 232-252.
- Wang, L., Ling, Y., Jiang, H., Qiu, Y., Qiu, J., Chen, H., Yang, R. y Zhou, D. (2013a). AphA is required for biofilm formation, motility, and virulence in pandemic *Vibrio parahaemolyticus*. *Int J Food Microbiol* **160**: 245-51.
- Wang, P. H., Lee, T. H., Ismail, W., Tsai, C. Y., Lin, C. W., Tsai, Y. W. y Chiang, Y. R. (2013b). An oxygenase-independent cholesterol catabolic pathway operates under oxic conditions. *PLoS One* **8**: e66675.
- Wang, P. H., Yu, C. P., Lee, T. H., Lin, C. W., Ismail, W., Wey, S. P., Kuo, A. T. y Chiang, Y. R. (2014). Anoxic androgen degradation by the denitrifying bacterium *Sterolibacterium denitrificans* via the 2,3-seco pathway. *Appl Environ Microbiol* **80**: 3442-52.
- Ward, O. P. y Young, C. S. (1990). Reductive biotransformations of organic compounds by cells or enzymes of yeast. *Enzyme Microb Technol* **12**: 482-93.
- Waters, C. M. y Bassler, B. L. (2005). Quorum sensing: cell-to-cell communication in bacteria. *Annu Rev Cell Dev Biol* **21**: 319-46.
- Wei, J. H., Yin, X. y Welander, P. V. (2016). Sterol synthesis in diverse bacteria. *Front Microbiol* **7**: 990.
- Wei, W., Fan, S., Wang, F. y Wei, D. (2010a). A new steroid-transforming strain of *Mycobacterium neoaurum* and cloning of 3-ketosteroid 9 α -hydroxylase in NwIB-01. *Appl Biochem Biotechnol* **162**: 1446-56.
- Wei, W., Wang, F. Q., Fan, S. Y. y Wei, D. Z. (2010b). Inactivation and augmentation of the primary 3-ketosteroid- Δ^1 -dehydrogenase in *Mycobacterium neoaurum* NwIB-01: biotransformation of soybean phytosterols to 4-androstene-3,17-dione or 1,4-androstadiene-3,17-dione. *Appl Environ Microbiol* **76**: 4578-82.
- Wei, W., Fan, S. Y., Wang, F. Q. y Wei, D. Z. (2014). Accumulation of androstadiene-dione by

overexpression of heterologous 3-ketosteroid Δ^1 -dehydrogenase in *Mycobacterium neoaurum* NwIB-01. World J Microbiol Biotechnol **30**: 1947-54.

Wick, L. M., Weilenmann, H. y Egli, T. (2002). The apparent clock-like evolution of *Escherichia coli* in glucose-limited chemostats is reproducible at large but not at small population sizes and can be explained with Monod kinetics. Microbiology **148**: 2889-902.

Wilbrink, M. H., Petrusma, M., Dijkhuizen, L. y van der Geize, R. (2011). FadD19 of *Rhodococcus rhodochrous* DSM43269, a steroid-coenzymeA ligase essential for degradation of C-24 branched sterol side chains. Appl Environ Microbiol **77**: 4455-64.

Wipperman, M. F., Yang, M., Thomas, S. T. y Sampson, N. S. (2013). Shrinking the FadE proteome of *Mycobacterium tuberculosis*: insights into cholesterol metabolism through identification of an $\alpha 2\beta 2$ heterotetrameric acyl coenzyme A dehydrogenase family. J Bacteriol **195**: 4331-41.

Wipperman, M. F., Sampson, N. S. y Thomas, S. T. (2014). Pathogen roid rage: cholesterol utilization by *Mycobacterium tuberculosis*. Crit Rev Biochem Mol Biol **49**: 269-93.

Wirth, R., Friesenegger, A. y Fieldler, S. (1989). Transformation of various species of gram-negative bacteria belonging to 11 different genera by electroporation. Mol Gen Genet **216**: 175-7.

Xu, L. Q., Liu, Y. J., Yao, K., Liu, H. H., Tao, X. Y., Wang, F. Q. y Wei, D. Z. (2016). Unraveling and engineering the production of 23,24-bisnorcholesterol in sterol metabolism. Sci Rep **6**: 21928.

Yam, K. C., D'Angelo, I., Kalscheuer, R., Zhu, H., Wang, J. X., Snieckus, V., Ly, L. H., Converse, P. J., Jacobs, W. R. Jr., Strynadka, N. y Eltis, L. D. (2009). Studies of a ring-cleaving dioxygenase illuminate the role of cholesterol metabolism in the pathogenesis of *Mycobacterium tuberculosis*. PLoS Pathog. **5**: e1000344.

Yang, X., Dubnau, E., Smith, I. y Sampson, N. S. (2007). Rv1106c from *Mycobacterium tuberculosis* is a 3- β -hydroxysteroid dehydrogenase. Biochemistry **46**: 9058-67.

Yang, X., Nesbitt, N. M., Dubnau, E., Smith, I. y Sampson, N. S. (2009). Cholesterol metabolism increases the metabolic pool of propionate in *Mycobacterium tuberculosis*. Biochemistry **48**: 3819-21.

Yang, M., Guja, K. E., Thomas, S. T., Garcia-Diaz, M. y Sampson, N. S. (2014). A distinct MaoC-like enoyl-CoA hydratase architecture mediates cholesterol catabolism in *Mycobacterium tuberculosis*. ACS Chem Biol **9**: 2632-45.

Yang, M., Lu, R., Guja, K. E., Wipperman, M. F., St Clair, J. R., Bonds, A. C., Garcia-Diaz, M. y Sampson, N. S. (2015). Unraveling cholesterol catabolism in *Mycobacterium tuberculosis*: ChsE4-ChsE5 $\alpha 2\beta 2$ acyl-CoA dehydrogenase initiates β -oxidation of 3-oxo-cholest-4-en-26-oyl CoA. ACS Infect Dis **11**: 110-25.

Yang, F. C., Chen, Y. L., Tang, S. L., Yu, C. P., Wang, P. H., Ismail, W., Wang, C. H., Ding, J. Y., Yang, C. Y., Yang, C. Y. y Chiang, Y. R. (2016) Integrated multi-omics analyses reveal the biochemical mechanisms and phylogenetic relevance of anaerobic androgen biodegradation in the environment. ISME J **10**: 1967-1983.

Yao, K., Wang, F. Q., Zhang, H. C. y Wei, D. Z. (2013). Identification and engineering of cholesterol oxidases involved in the initial step of sterols catabolism in *Mycobacterium neoaurum*. Metab Eng **15**: 75-87.

Yao, K., Xu, L. Q., Wang, F. Q. y Wei, D. Z. (2014). Characterization and engineering of 3-ketosteroid-

Δ 1-dehydrogenase and 3-ketosteroid-9 α -hydroxylase in *Mycobacterium neoaurum* ATCC 25795 to produce 9 α -hydroxy-4-androstene-3,17-dione through the catabolism of sterols. *Metab Eng* **24**: 181-91.

Yeh, C. H., Kuo, Y. S., Chang, C. M., Liu, W. H., Sheu, M. L. y Meng, M. (2014). Deletion of the gene encoding the reductase component of 3-ketosteroid 9 α -hydroxylase in *Rhodococcus equi* USA-18 disrupts sterol catabolism, leading to the accumulation of 3-oxo-23,24-bisnorcholesta-1,4-dien-22-oic acid and 1,4-androstadiene-3,17-dione. *Microb Cell Fact* **13**: 130.

Yildirim, K., Kupcu, I. y Gulsan, F. (2010). Biotransformation of some steroids by *Aspergillus wentii*. *Z Naturforsch C* **65**: 688-92.

Yin, S. J., Vagelopoulos, N., Lundquist, G. y Jörnvall, H. (1991). *Pseudomonas* 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase. Primary structure and relationships to other steroid dehydrogenases. *Eur J Biochem* **197**: 359-65.

Yu, C. P., Roh, H. y Chu, K. H. (2007). 17 β -estradiol-degrading bacteria isolated from activated sludge. *Environ Sci Technol* **41**: 486-92.

Yuan, J., Chen, G., Cheng, S., Ge, F., Qiong, W., Li, W. y Li, J. (2015). Accumulation of 9 α -hydroxy-4-androstene-3,17-dione by co-expressing *kshA* and *kshB* encoding component of 3-ketosteroid-9 α -hydroxylase in *Mycobacterium* sp. NRRL B-3805. *Sheng Wu Gong Cheng Xue Bao* **31**: 523-533 (Artículo en chino).

Yücel, O., Drees, S., Jaqmann, N., Patschkowski, T. y Philipp, B. (2016). An unexplored pathway for degradation of cholate requires a 7 α -hydroxysteroid dehydratase and contributes to a broad metabolic repertoire for the utilization of bile salts in *Novosphingobium* sp. strain Chol11. *Environ Microbiol* **18**: 5187-203.

Yue, Q. K., Kass, I. J., Sampson, N. S. y Vrielink, A. (1999). Crystal structure determination of cholesterol oxidase from *Streptomyces* and structural characterization of key active site mutants. *Biochemistry* **38**: 4277-86.

Zhang, Y., Yao, C., Wang, M., Lu, Y. y Wang, Z. (1998). Transformation of cortisone acetate using immobilized *Arthrobacter simplex* cells. *Chin J Biotechnol* **14**: 117-23.

Zhang, H., Tian, Y., Wang, J., Li, Y., Wang, H., Mao, S., Liu, X., Wang, C., Bie, S. y Lu, F. (2013a). Construction of engineered *Arthrobacter simplex* with improved performance for cortisone acetate biotransformation. *Appl Microbiol Biotechnol*. **97**: 9503-14.

Zhang, W., Shao, M., Rao, Z., Xu, M., Zhang, X., Yang, T., Li, H. y Xu, Z. (2013b). Bioconversion of 4-androstene-3,17-dione to androst-1,4-diene-3,17-dione by recombinant *Bacillus subtilis* expressing *ksdd* gene encoding 3-ketosteroid- Δ 1-dehydrogenase from *Mycobacterium neoaurum* JC-12. *J Steroid Biochem Mol Biol* **135**: 36-42.

Zhang, H., Ji, Y., Wang, Y., Zhang, X. y Yu, Y. (2015). Cloning and characterization of a novel β -ketoacyl-ACP reductase from *Comamonas testosteroni*. *Chem Biol Interact* **234**: 213-20.

Zhang, X., Rao, Z., Zhang, L., Xu, M. y Yang, T. (2016). Efficient 9 α -hydroxy-4-androstene-3,17-dione production by engineered *Bacillus subtilis* co-expressing *Mycobacterium neoaurum* 3-ketosteroid 9 α -hydroxylase and *B. subtilis* glucose 1-dehydrogenase with NADH regeneration. *Springerplus* **5**: 1207.

Žnidaršič-Plazl, P. y Plazl, I. (2010). Development of a continuous steroid biotransformation process and product extraction within microchannel system. *Catal Today* **157**: 315–20.

Zorko, M., Gottlieb, H.E. y Zakelj-Mavric, M. (2000). Pluripotency of 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase from the filamentous fungus *Cochliobolus lunatus*. *Steroids* **65**: 46-53.

X. ANEXOS

ANEXO I

<i>Bam</i> HI	<i>Eco</i> RI	RBS	<i>Nde</i> I
CG GGATCC CG GAATTC TGACCTA AGGAGG TGAAT CATATG CCGCACGTGG			
AGAACGCCTCGGAGACCTACATCCCGGGCCGCCTGGACGGCAAGGTGGCC			
CTGGTGACCGGCTCGGGCCGCGGCATCGGCGCCGCGTGGCCGTGCACCT			
GGGCCGCCTGGGCGCCAAGGTGGTGGTGAACCTACGCCAACTCGACCAAGG			
ACGCCGAGAAGGTGGTGTCTCGGAGATCAAGGCCCTGGGCTCGGACGCCATC			
GCCATCAAGGCCGACATCCGCCAGGTGCCGGAGATCGTGAAGCTGTTCTGA			
CCAGGCCGTGGCCCACTTCGGCCACCTGGACATCGCCGTGTCTGAACCTCGG			
GCGTGGTGTCTGTTCTGGCCACCTGAAGGACGTGACCGAGGAGGAGTTCTGAC			
CGCGTGTCTCTCGCTGAACACCCGCGGCCAGTTCTTCGTGGCCCCGCGAGGC			
CTACCGCCACCTGACCGAGGGCGGCCGCATCGTGCTGACCTCGTCGAACA			
CCTCGAAGGACTTCTCGGTGCCGAAGCACTCGCTGTACTCGGGCTCGAAG			
GGCGCCGTGGACTCGTTCTGTGCGCATCTTCTCGAAGGACTGCGGCGACAA			
GAAGATCACCGTGAACGCCGTGGCCCCGGGCGGCACCGTGACCGACATGT			
TCCACGAGGTGTCTGCACCACTACATCCCGAACGGCACCTCGTACACCGCC			
GAGCAGCGCCAGCAGATGGCCGCCACGCCTCGCCGCTGCACCGCAACGG			
CTGGCCGCAGGACGTGGCCAACGTGGTGGGCTTCCTGGTGTCTGAAGGAGG			
GCGAGTGGGTGAACGGCAAGGTGCTGACCCTGGACGGCGGCGCCGCC TAA			
AAGCTT CCCC GTCTGACACTAGTC			
<i>Hind</i> III	<i>Sal</i> I	<i>Spe</i> I	

Anexo I. Secuencia génica que codifica la enzima 17 β -HSD de *C. lunatus* con uso de codón optimizado para su expresión en *Mycobacterium*. Se indican las secuencias que corresponden al sitio de unión del ribosoma (RBS), codón de inicio y codón de terminación de la traducción. Varias secuencias de reconocimiento por enzimas de restricción se incorporaron en el diseño para facilitar tareas de subclonación.

ANEXO II

CLUSTAL O(1.2.4) multiple sequence alignment

↓

```

MSPYR1_RS19560      MTDSADSGSGRKPLAATSYALLGLLSYEQELSGYDIRKWIGWTMRFFYYGSPAYSQIYSE
TY28_RS12030        MTEHAGGE-TDGLNVSPGTGWTLLGMLSGGDELSGYDIKKWLNWSMRFFYSPPAYSQIYSE
MSMEG_2868          MTDAADTF-LGELNVSPGTGWTLLGMLSGGDELSGYDIKKWINWAIQFFYSPPAYSQIYSE
Mvan_2867            -----MSPTGWALLGMLSGGEEMSGYDIKKWINWAIQFFYSPPAYSQIYSE
SCNU_19015           -----MLSFNEEVSGYDIKRWDWSIGHFYWSPSFSQVYSE
RHA1_RS12150        MPSSDPTQSSGFAGLRSTSWPVLGILSFGEELSGYDLKKWASYSVRFFYWSPSFSQVYSE
RHA1_RS40155        MPT---PVRRSHPDLPATSWAVLGMLSFGEELTGNDLKKWADWSIGFFYWSPSVSQVYAE
D092_19455          -----MLGVLALGEEMTGNDVKKWADWSLSFFYWSPSVSQVYGE
                        *:  *:  *  *:  *  .:  .:  *:  *:  *:  *:

MSPYR1_RS19560      LKKLESGLVTSRVESTGGA--RSRRLYKIAPAGLDEVIRWANDEPFDPPLKHGPLLRM
TY28_RS12030        LKKLEKQGMVSSRVE--GGV--RSRRVYKIADVGLAAVTQWANDNEVEPPTLKHNPLMRV
MSMEG_2868          LKRLERLGLVSSRVD--AGA--RSRRMYKITDAGLSAVTRWANEEAVEPPTLKHNPLMRV
Mvan_2867            LKRLERLGLVSSRVD--AGV--RSRRMYKITESGLAAVTRWANEDPVEAPPTLKHNPLMRV
SCNU_19015           LKRLEKLGLARSRTVSEPGE--RSRRLYAITDEGLAASRQWVSSAPVDPMLKHPMVMRI
RHA1_RS12150        LKKLEDLGYVTSRTVVDDEARVKPKRLYKITDAGMAVMRSWAREAPIDPPVLKHGVMLRM
RHA1_RS40155        LKKLENLALVRSRTVAEVGA--RGRVYAITQSGATALRDWSDAPVEMPVLKHGVMLRL
D092_19455          LKKLEKLGFVRSRSISEPGA--RSRRVYSITPTGVGAVRAWSREAPVEAPVLKHGVMLRM
                        **:  **  .  .  **  :  *:  *:  *  .  .:  *  **  *:  *:

MSPYR1_RS19560      TFGHLSTPARLKELLNEHIAYADDMEREAADARLAGADPSWAYARVALRWAERYANER
TY28_RS12030        IFGHLLKPGRLREVLQSHAAYADEMHRDAAMEARWAGEQPAWSYARLALRWSEDYAAER
MSMEG_2868          MLGHLLKPGRLREVLAEHADYADRMHQAAATEARWTEQPAWSYAGLALRWSEYAAER
Mvan_2867            MLGHLLKPGRLREILAGHAAYAEQLQQAATEVVRWTSEQPAWSYARLALRWSEYAAER
SCNU_19015           WLGHMSSPTDLKARLREYLDLDERVRAQVAGDAELARSEAAWSYPRLALEWAHAHYETER
RHA1_RS12150        WLGHLTEPEQLKDALKHEHISYVEGMSRQAALDARDSDVEPTWAFAMVNKWSERYAAES
RHA1_RS40155        WMGHLEPERLKSIVREHIANLEANARDAGRHAHNSNDEPAWAFSRMSLRWADRHLRAEI
D092_19455          YLGHLENEPEKLKSIVRDHIANLEENLGRVRDYADHSDVEPSWAFPLLSLRWSERYFRAEI
                        *:  *  *  :  :  :  .  .  :  :  *:  :  .  *:  .  :  *

MSPYR1_RS19560      ELALQMIKDLDEAAEFPPRAAHGDQAAVAWP-EPAYWYEVEQRAQSEADS-----
TY28_RS12030        ERALRMKDLDAVEETFAQ---GGGLAGRFP-LREYWYDVERRIAAEGTGDA LGDA---
MSMEG_2868          ELALQMIKDLDAVEAQLAEE---TGAQNMEFP-VREYWYEVERRIAAEETDETPPGAQ---
Mvan_2867            ELALQMIKDLDAEEAFGE---AGREGVQFP-MPEYWYEVERRIAAEDTP---GVE---
SCNU_19015           DLTLLRLIDSIDETQRELA--PALHDDGRLIPPAPGRWQEVGEIGKRQREQN-----
RHA1_RS12150        ELAKQMLADIDEAVERMHGEGTPEHPGVKPTASHSIRRSREAAQKEYQAAMKAAQDADDE
RHA1_RS40155        ELAEQLLEDIDEAAQWFRDETVDVNGVPRPRHPGRWRYAEDAGD-----PSGDQHS
D092_19455          GLFEELLDEIDEAAARFA-RSDIDENGVPHPRRRGGWRTVEQMLS-----AHDEDDD
                        .:  .:  *  .  :  :  *

MSPYR1_RS19560      -----
TY28_RS12030        --AS--
MSMEG_2868          --RPD-
Mvan_2867            --DPSA
SCNU_19015           -----
RHA1_RS12150        AERED-
RHA1_RS40155        R-----
D092_19455          GSGPAG

```

Anexo II. Alineamiento de secuencias proteicas de reguladores transcripcionales PadR de distintas actinobacterias. Las secuencias se identifican con la nomenclatura de la anotación génica correspondiente: *MSPYR1_RS*(número), *M. gilvum* Spyr1; *TY28_RS*(número), *M. neoaurum* DSM 44074; *MSMEG_*(número), *M. smegmatis* mc²155; *MVAN_*(número), *M. vanbaalenii* PYR-1; *SCNU_*(número), *G. neofelifaecis* NRRL-B59395; *RHA1_RS*(número), *R. jostii* RHA1; *D092_ro*(número), *R. ruber* str. Chol-4.